

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

547.466

Г-42

А.А.Гершкович

В.К.Кибирев

Синтез пептидов Реагенты и методы

Академия наук Украинской ССР
Институт органической химии

А.А.Гершкович,
В.К.Кибирев

СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ.
РЕАГЕНТЫ И МЕТОДЫ

Киев Наукова думка 1987

Синтез пептидов. Реагенты и методы / Гершкович А.А.,
Кибирев В.К. - Киев : Наук. думка, 1987. - 264 с.

Монография посвящена современным методам и реагентам, используемым для синтеза пептидов - важнейших регуляторов биохимических процессов в организме. Приводятся техника и методика получения конденсирующих средств, отражены способы защиты и деблокирования функциональных групп аминокислот и пептидов. Осуществлена классификация реагентов по принципу химического строения. Кратко описываются механизмы активации карбоксильной группы, реакций образования пептидных связей и процессов, происходящих при удалении защитных групп. В таблицах представлены характеристики многочисленных производных аминокислот и полупродуктов для синтеза пептидов.

Для студентов, аспирантов, преподавателей и научных сотрудников химического и биологического профиля.

Ил. 10. Табл. 44. Библиогр.: с. 244-260 (345 назв.).

Ответственный редактор С.Б.Серебряный

Рецензенты Г.И.Чипенс, В.В.Шилин

Редакция химической литературы

О Т Р Е Д А К Т О Р А

Настоящая книга рассчитана главным образом на исследователей, начинающих работать в области синтеза пептидов. На русском языке имеется лишь одно руководство подобного типа, содержащее подробные прописи синтеза пептидов и полупродуктов для них, - монография Дж. Гринштейна и М.Виница "Химия аминокислот и пептидов", изданная еще в 1965 г. Многие методики, рекомендованные в ней, уже устарели, и поэтому возникла настоятельная необходимость в пособии, отражающем современное состояние техники и методики пептидного синтеза.

В монографии А.А.Гершковича и В.К.Кибирева, методическую основу которой составляют оригинальные работы отечественных и зарубежных авторов, систематизированы препаративные достижения современной химии пептидов.

Специалистам, начинающим работать в области синтеза пептидов, бывает весьма непросто ориентироваться в том огромном наборе реагентов, который предлагают многие авторы в специальных журналах и рекламируют многочисленные производители биохимических препаратов. Практика показывает, что даже сравнительно небольшие пептиды не всегда удается получить с хорошим выходом и с высокой степенью чистоты, особенно если отсутствуют навыки в работе с олигопептидами. Порой в процессе работы приходится менять схему синтеза конкретного пептида, переходить к более современным способам конденсации и новым защитным группам. Своевременное и правильное изменение схемы синтеза также представляет немалые трудности для начинающих химиков. Авторы монографии поставили перед собой цель - помочь им в трудном деле рационального выбора необходимой стратегии и тактики пептидного синтеза. Ими обобщен большой фактический материал и приведены не только хорошо зарекомендовавшие себя методики и препараты, но и новые перспективные реагенты, а также рассмотрены механизмы соответствующих процессов и побочных реакций. Авторы нередко акцентируют внимание читателя на тех деталях эксперимента, которые в оригинальных работах порой опускаются. Незнание этих тонкостей часто является причиной неудовлетворительной воспроизводимости различных методических приемов.

Настоящее издание будет весьма полезным для всех, кто интересуется проблемами синтеза пептидов и вообще проблемами синтеза органических соединений.

Профессор С.Б.Серебряный

Г 1803000000-223 232-87
М221(04)-87

С Издательство "Наукова думка", 1987

Идея написания данной монографии появилась у нас в процессе накопления данных по химическому синтезу пептидов. Работ, содержащих как экспериментальные методики, так и необходимые данные справочного характера, в настоящее время, к сожалению, нет. Такая книга была бы особенно полезна молодым исследователям, которым трудно ориентироваться в довольно большом количестве разнообразных методик, как хорошо спробированных, так и предложенных сравнительно недавно.

При написании монографии использованы многочисленные публикации советских и зарубежных авторов, наш собственный опыт, а также те препаративные "секреты", которые передали нам в процессе личного общения коллеги из ведущих лабораторий Москвы, Риги, Ленинграда и Пушкино-на-Оке. Хотелось бы отметить, что они не только одобрили идею создания подобного руководства, но и во многом помогли нам.

Надеемся, что наша попытка систематизировать экспериментальный и теоретический материал поможет начинающим исследователям в их работе и, возможно, будет способствовать созданию новых эффективных реагентов для синтеза пептидов. Выбор нами методик субъективен, поэтому будем признательны читателям, которые укажут на имеющиеся в книге недостатки.

Нам хотелось бы поблагодарить Ф.М.Мутулиса и Р.Э.Вегнера, прочитавших рукопись книги и сделавших ряд ценных замечаний, В.Ф.Позднева, любезно предоставившего некоторые из методик, а также профессора С.Б.Серебрянского, взявшего на себя труд по редактированию монографии.

- АК - аминокислота
- БТФА -(трио)трифторацетат бора
- ДМСО - диметилсульфоксид
- ДЦК - N,N'-дициклогексикарбодимид (DCC)
- ДЦМ - N,N'-дициклогексилмочевина
- ОБТ - 1-оксобензотриазол (OBT)
- ПСА-метод - метод последовательного синтеза пептидов с использованием избытка смешанных ангидридов (NEMA)
- ТГФ - тетрагидрофуран
- ЭЭДХ - N-этилосикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолин (EEDQ)
- Ac - ацетил
- AcOH - уксусная кислота
- Ac₂O - уксусный ангидрид
- AOC - трет-амилоксикарбонильная защитная группа
- BOC - трет-бутилоксикарбонильная защитная группа
- BuOH - бутанол
- Bu⁺ - трет-бутил
- BZ - бензоил
- Bzl - бензил
- BOC-Cl - N,N'-бис-(2-оксо-3-оксазолидинил)фосфородиамидохлорид
- (BOC)₂O - ди-трет-бутилпиноксикарбонат
- Et₃N - триэтиламин
- EtOAc - этилацетат
- EtOH - этанол
- EEDQ - N-этилосикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолин
- Fmoc - 9-флуоренилметилоксикарбонильная группа

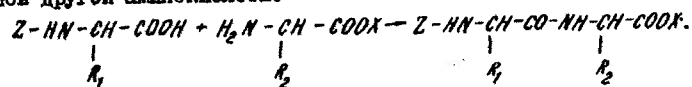
¹ Для обозначения аминокислот используется общепринятая трехбуквенная символика согласно правилам ИЮПАК.

For - формильная группа
 MBZ - метоксибензоульфонильная группа
 Me - метил
 MeOH - метанол
 NMM - N-метилморфолин
 NpS - o-нитрофенилсульфения
 Nер - 2-нитро-4-сульфофенилсвй эфир
 NCA - N-карбоксиангидрид аминокислоты
 OBu^t - трет-бутилсвй эфир
 OBZl - бензиловый эфир
 OEt - этиловый эфир
 OMe - метиловый эфир
 ONB - п-нитробензиловый эфир
 ONp - п-нитрофенилсвй эфир
 OPfp - пентафторфенилсвй эфир
 Ph - фенил
 TFA - трифторацетильная группа
 Tos - тсэильная группа
 Trt - тритильная группа
 Z - бензилоксикарбонильная группа (КБЗ)

ВВЕДЕНИЕ

"Среди химиков-органиков широко бытует мнение, что синтез пептидов является искусством или даже таинством со своей собственной символикой, языком и ритуалом, нечто совершенно чуждое интересам тех, кто работает в других областях", - писал известный чехословацкий специалист в области пептидной химии Й. Рудингер в 1963 г. В статье "Органическая химия в синтезе пептидов" он показал, что в химии пептидов широко используются методы синтетической органической химии, однако выбор этих методов должен соответствовать требованиям к синтезу биополимеров, какими являются полипептиды.

Процесс образования пептидной связи представляет собой реакцию ацилирования α-аминогруппы одной аминокислоты α-карбоксильной группой другой аминокислоты:



Символы Z и X обозначают защитные группы для амино- и карбоксильной групп, необходимые для того, чтобы реакция шла только в одном направлении. Обычно защите подлежат также некоторые боковые функциональные группы аминокислот - амино-, карбокси-, гуанидиновая, окси-, меркаптогруппы и др.

Процесс образования пептидной связи термодинамически невыгоден и может идти лишь в жестких условиях. Поэтому нужны реагенты, которые активируют карбоксильную группу (иногда аминогруппу) таким образом, что реакция образования пептидной связи происходит в мягких условиях и не приводит к потере оптической активности аминокислот, обусловленной хиральностью их α-углеродного атома (т.е. к рацемизации). В настоящее время разработаны методы, вполне отвечающие требованиям пептидного синтеза [1-13].

Реагенты и методы, необходимые для успешного синтеза биологически активных пептидов, должны обеспечивать: 1) максимальные скорости протекания реакции образования пептидной связи, высокий выход целевого продукта при минимальной рацемизации; 2) минимум побочных реакций; 3) легкое удаление промежуточных продуктов реакции; 4) большой выбор защитных групп, позволяющий их селективное удаление; 5) относительную доступность и дешевизну реагентов.

Полвека потребовалось химикам для того, чтобы установить строение белковой молекулы и синтезировать первый биологически активный пептид. В 1954 г. группа д-ра Винье синтезировала небольшой гормон ок-

ситацин, а уже через 10 лет Цан с сотр. получили В-цепь инсулина, состоящую из 30 аминокислот. 1969 год ознаменовался крупной победой синтетической пептидной химии - две группы исследователей одновременно сообщили об успешном синтезе рибонуклеазы, состоящей из 124 (рибонуклеаза А) и 104 (рибонуклеаза S) аминокислот. Первый синтез проведен твердофазным методом группой Маррифилда, второй - N-карбоксивангидридным методом Хиршманом с соавт. Синтезированные ферменты обладали высокой активностью.

Хотя уже получено большое количество полипептидов, содержащих порядка 100 аминокислот (среди них хочется отметить синтез 74-членного α -бунгаротоксина, осуществленный группой советских химиков под руководством чл.-кор. АН СССР В.Т.Иванова), следует признать, что зачастую синтез даже небольших пептидов является довольно сложной задачей, если исследователь еще не приобрел определенных навыков и опыта как на стадии выбора оптимальной стратегии синтеза, так и непосредственно на этапе синтеза и очистки пептидов. Успеху пептидного синтеза на современном этапе способствует постоянное развитие методов синтеза и эффективных методов очистки пептидов.

Следует отметить, что хотя в процессе создания пептидной связи мы имеем дело только с одной реакцией, что позволило автоматизировать процесс (в твердофазном методе), тем не менее скорость реакции, полнота ее прохождения и степень рацемизации часто зависят от характера соединяемых остатков, длины синтезируемой цепи, типа защитных групп, растворителя и других факторов. Поэтому пептидный синтез не всегда может быть унифицирован и часто требует творческого подхода в выборе реагентов, условий синтеза и оптимальной схемы построения полипептидной цепи.

Несмотря на впечатляющие успехи пептидной химии и ее непрерывное совершенствование, синтез белков химическими методами еще очень несовершенен по сравнению с их биосинтезом в живом организме. Лишь твердофазный метод в какой-то степени моделирует синтез белка на рибосоме (поскольку растущая полипептидная цепь привязана к нерастворимой матрице). Однако, несмотря на огромные преимущества этого метода, он значительно уступает биосинтезу белка по скорости реакции, оптической чистоте и однородности получаемого продукта.

Безусловно интересной и перспективной стратегией, развиваемой очень интенсивно в последнее десятилетие, является ферментативный синтез пептидов. Ввиду обратимости реакции гидролиза пептидной связи протеолитическими ферментами оказалось возможным их использование в качестве синтетаз. Метод в определенной степени обладает преимуществами биосинтеза белков: мягкими условиями проведения реакции в водном

растворе, возможностью обходиться без защиты боковых функциональных групп, высокой оптической чистотой получаемых пептидов. Достаточно высокая стереоспецифичность применяемых ферментов позволяет получать оптически чистые продукты даже из исходных компонентов низкой оптической чистоты, что может иметь большое значение в промышленном пептидном синтезе.

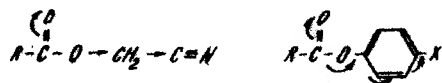
Все существующие принципиально различающиеся способы пептидного синтеза (классический способ синтеза в растворе, твердофазный метод и синтез с использованием ферментативного катализа) обладают определенными преимуществами и специфическими недостатками, поэтому оптимально могут использоваться только с учетом поставленной исследователем задачи. Так, твердофазный метод обеспечивает высокую производительность и возможность автоматизации процесса, классический - высокую степень чистоты синтезированных пептидов, а ферментативный - большую оптическую чистоту получаемых продуктов. Указанные методы часто дополняют друг друга - твердофазный и ферментативный способы используют для конденсации пептидных блоков, полученных классическими методами.

Таким образом, способы синтеза пептидов не исключают, а лишь дополняют друг друга, причем традиционный метод синтеза в растворе остается главным для получения препаратов высокой чистоты для любых целей.

Рассмотрим основные методы классической пептидной химии, применяемые в настоящее время.

1.1. СПОСОБЫ АКТИВАЦИИ КАРБОКСИЛЬНОЙ ГРУППЫ

Образование пептидной связи представляет собой нуклеофильную атаку аминогруппой одной аминокислоты карбонильного атома углерода другой аминокислоты. Это достигается превращением COOH -группы в такие производные, где есть заместители (атом или группа атомов), "оттягивающие" электроны за счет индукционного эффекта электроотрицательных заместителей или эффекта сопряжения с π -электронной системой

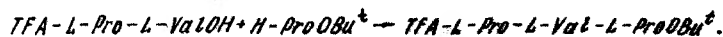


Высокая реакционная способность таких активированных эфиров, как пикратехиновые или 4-оксипиридиновые, объясняется также внутримолекулярным катализом.

В табл. 1 приведены основные методы и реагенты активации карбоксильной группы N -защищенных аминокислот и пептидов. Часть из них хорошо себя зарекомендовала и находит широкое применение в синтезе пептидов, а некоторые предложены недавно, но весьма перспективны.

Наиболее широко применяются следующие методы образования пептидной связи: 1) карбодимидный; 2) азидный; 3) смешанных ангидридов; 4) активированных эфиров; 5) карбокомангидридный.

При использовании дидиклогексилкарбодимид для уменьшения рацемизации часто применяют "нуклеофильные добавки". С этой целью наиболее часто применяют 1-оксисбензотриазол, N -оксисукцинимид, пентафторфенс. Кениг и Гейгер [40] тщательно исследовали влияние нуклеофильных добавок на степень рацемизации пептидов, полученных DCC -методом, на следующей модельной реакции:



Карбодимидную конденсацию вели в течение 1 ч при 0°C , а затем 1 ч при 20°C в различных растворителях. В качестве основания использовали N -этилморфолин. В табл. 2 представлены данные, полученные этими авторами в диметилформамиде.

В модельных системах создаются условия, в которых имеет место заведомо высокая рацемизация. Из доступных реагентов этот нежелательный процесс сильно снижает 1-оксисбензотриазол.

В качестве добавок, снижающих рацемизацию, авторы работы [45]

Таблица 1. Реагенты и методы активации карбоксильной группы

Метод активации	Формула реагента	Название реагента	Формула промежуточного активированного соединения	Примечание	Интересный источник
Карбодимидный метод		N,N' -Дихлорогексилкарбодимид		Наиболее широко используемый реагент для синтеза пептидов. Применяется и для получения активированных эфиров	[24]
Кетенильный метод		N,N' -(2-морфолин)-(4-этил)-карбодимид		Растворим в воде. Используется для синтеза пептидов и модификации белков	[15]
Использование производных ацетилена		N,N' -(п-диметиламино)гексаметиленкарбодимид		Растворим в воде. Используется для синтеза пептидов и белков, модификации белков	[15]
Кетенильный метод		Дифенилкетен-пара-толуилин		Широкого применения не нашел	[16]
Использование производных ацетилена		Этоксинацетилен		В настоящее время не используется	[17]

Метод активации	Формула реагента	Название реагента	Формула промежуточного активированного соединения	Примечание	Литературный источник
Использование производных цианамидов	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{N}-\text{C}=\text{C}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$	4-Диметиламино-3-бутин-2-он	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}-\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{N}(\text{CH}_3)_2 \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$	Предложен недавно. Дает очень высокий выход пептидов	[18]
Изоксазолиновые соли	$\begin{array}{c} \text{R}_1 \\ \\ \text{N}=\text{C}-\text{N}-\text{R}_2 \end{array}$	N, N'-Диазменитные цианамиды	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}-\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{N}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$	Практического применения не нашли	[20]
Умидоизалонины	$\begin{array}{c} \text{SO}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4-\text{C}-\text{CH} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{N} \\ \\ \text{H} \end{array}$	N-Этил-5-фенил-изоксазол-3'-сульфонат (реагент Вулворта)	$\begin{array}{c} \text{SO}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4-\text{C}-\text{CH}-\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{N} \\ \\ \text{H} \end{array}$	Применяется реже, чем ДПК	[21]
Смешанные ангидриды (о неорганических кислотах)	$\begin{array}{c} \text{R}_1 \\ \\ \text{R}_2-\text{C}-\text{N}-\text{N}-\text{R}_3 \\ \\ \text{X}-\text{Cl}, \text{Br} \end{array}$	Активация через образование ангидридов	$\begin{array}{c} \text{R}-\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{R}_1 \\ \\ \text{N} \\ \\ \text{H} \end{array}$	Предложен для синтеза пептидов в водных растворах	[22]
Хлорангидридный метод (о соляной кислоте)	RCH_2Cl	Пятихлористый фосфор, твония хлористый	$\begin{array}{c} \text{SO} \\ \\ \text{R}-\text{C}-\text{Cl} \end{array}$	Практически не используется из-за значительной расщепляемости	[23]
Азидный метод (с азотсодержащей азидной кислотой)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}-\text{C}-\text{NH}-\text{NH}_2 \end{array}$	Нитрит натрия в соляной кислоте, грег-бутилнитрит, гидразиды защищенных аминокислот и пептидов	$\begin{array}{c} \text{SO} \\ \\ \text{R}-\text{C}-\text{NH}_2 \end{array}$	Часто используется для конденсации пептидных фрагментов. Не дает расщепляемости	[24]
Метод смешанных ангидридов с угольной кислотой	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{RO}-\text{C}-\text{Cl} \end{array}$	Алкильные эфиры угольной кислоты, NH_3	$\begin{array}{c} \text{SO} \\ \\ \text{RO}-\text{C}-\text{O} \end{array}$	Широко применяется для синтеза пептидов	[25]
Использование EEDP	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4-\text{C}-\text{O} \\ \\ \text{N} \end{array}$	N-Карбокси-2-азокси-1,2-дигидроксиин	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}-\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)_2 \\ \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$	Популярный реагент, но используется реже, чем ДПК	[26]
Использование смешанных ангидридов на основе производных фосфорной кислоты	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Cl}-\text{P}-\text{O} \\ \\ \text{O} \end{array}$	Дифенилхлорфосфат	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}-\text{C}-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2\text{OEt} \end{array}$	Широкого применения не нашли	[25]
Использование BOP-хлорида (BOP-хлорида)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Cl}-\text{P}-\text{O} \\ \\ \text{O} \end{array}$	Диэтилбромфосфат	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}-\text{C}-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2\text{OEt} \end{array}$	Предложен недавно	[27]
Использование BOP-хлорида (BOP-хлорида)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Cl}-\text{P}-\text{O} \\ \\ \text{O} \end{array}$	N, N'-Бис-(2-оксо-3-оксазолин)-фосфорилимидохлорид, BOP-Cl	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}-\text{C}-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2\text{OEt} \end{array}$	Новый, довольно перспективный реагент	[28]
Смешанные ангидриды с органическими кислотами	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}_1-\text{C}-\text{Cl} \end{array}$	Извалонилхлорид $\text{R}_1 = (\text{CH}_3)_3\text{C}-$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}-\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{O} \\ \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$	Используется редко	[29]

Метод активации	Формула реагента	Название реагента	Формула промежуточного активированного соединения	Примечание	Литературный источник
Симметричные ангидриды защищенных аминокислот					
"H ₂ -H ₂ "-метод	2 моль-эквивалента H ₂ -защитной аминокислоты и 1 моль-эквивалент ДПК			Используется в основном для твердофазного синтеза пептидов	[31]
N-Карбоксимангидриды	H ₂ N-CH(R)-COOH, COCl ₂			Используется не очень часто в связи с возможностью протекания побочных реакций	[30]
Карбонилимидазольный метод		Активация через образование активированных амидов N,N'-Карбонилимидазол		Иногда используется для синтеза пептидов	[32]
Алфатические эфиры (метод цинметилсоль)		Метод активированных эфиров Хлорацетонатри		Один из первых методов для синтеза пептидов, используемых для синтеза пептидов	[33]
Тиофениловые эфиры		Тиофенол или 4-нитротифенол, ДПК		В настоящее время не применяется	[34]
Замененные фениловые эфиры		Карбонилимид и замещенные фенолы: 4-нитро, 2-нитро, 2,4,5-трихлор-, пентахлор- и пентафторированные и др.		Нельзя использовать при удалении защитных групп гидролизом	[4]
Сложные эфиры о гетероароматическими соединениями		8-Оксихинолин, ДПК		Наряду с ДПК являются наиболее распространенными реагентами для синтеза пептидов	[35]
Сложные эфиры с производными гидроксимина		2-Оксихипридин или 3-оксихипридин, ДПК		Высокореакционные соединения. Широкого применения не нашли	[36]
		Ацетоном, ДПК		Реакционноспособные соединения.	[37]
		N-Оксифталатил, ДПК		Широкого применения не нашли	[38]
				Используется редко	[39]
				В настоящее время не используется	[38]

Метод активации	Формула реагента	Название реагента	Формула промежуточного активированного соединения	Примечание	Литературный источник
Реагенты перегерификации (вариант метода активированных эфиров)		N-Оксисукцинимид, ДПГК		Широко используется для синтеза пептидов	[39]
		1-Оксисбензотриазол, ДПГК		Обычно в свободном виде не применяется. Не дает рацемизации	[40]
		O-Трифторацетил-N-оксисукцинимид		*Реагент Сакамоти	[41]
		O-Трихлорацетилпентахлорфенол		Отмечена рацемизация при его использовании в синтезе пептидов	[42]
		O-Трихлорацетилпентафторфенол		Рацемизация отсутствует	[43]
		1-β-Нафтилсульфонил-оксисбензотриазол		Удобен для синтеза пептидов, рацемизация не дает	[44]

Таблица 2. Степень рацемизации модельного пептида в присутствии нуклеофильных добавок [40]

Нуклеофильная добавка	Количество используемого реагента, моль	Степень рацемизации в ДМФА, %
Без нуклеофильной добавки	—	38
Пентахлорфенол	2	27
N-Оксисукцинимид	2	17,2
1-Оксисбензотриазол	1	3,4
3-Окси-4-окси-3,4-дигидро-1,2,3-бензотриазин	1	1,0

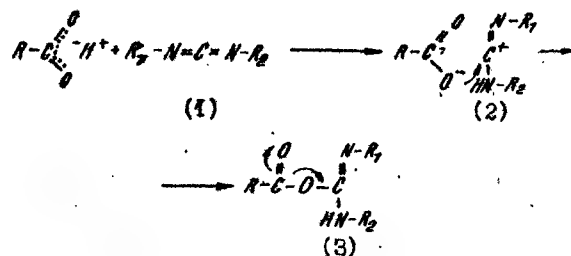
испытали некоторые кислоты Льюиса: хлориды цинка, олова, титана, сурьмы и алюминия. Установлено, что в ДМФА $ZnCl_2$ более эффективно подавляет рацемизацию, чем 1-оксисбензотриазол.

Помимо дициклогексилкарбодимидов удобными конденсирующими реагентами, предложенными в последнее время, являются реагенты перегерификации. Ниже они рассматриваются более подробно.

1.2. МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ КАРБОКСИЛЬНОЙ ГРУППЫ

1.2.1. Реагенты группы енольных эфиров

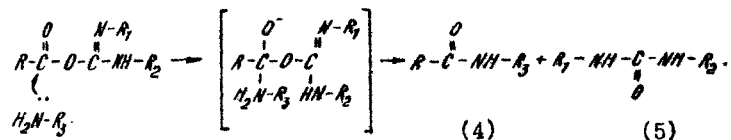
Карбодимиды. Карбодимиды — соединения общей формулы (1), способны легко реагировать с карбоновыми кислотами с образованием реакционноспособных O-ацилизоамочевин (3). Изучение механизма этой реакции показало, что, по-видимому, вначале протон отрывается от карбоксильной кислоты и затем присоединяется к двойной связи карбодимиды:



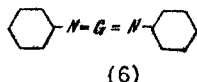
Образовавшийся карбокатион (2) подвергается нуклеофильной атаке карбоксильным анионом, и образуется O-ацилизоамочевина. В результате смещения электронов, как это показано в формуле (3), происходит заметное снижение плотности электронов на карбонильном атоме углерода,

что обуславливает значительную реакционную способность *O*-ацилизо-мочевин (3). В зависимости от условий реакции и природы нуклеофильного агента при реакции ДПГК с *N*-защипенными аминокислотами могут образоваться симметричные ангидриды, пептид, *N*-ацилмочевина и 5(4H)-оксазолон. Два последних соединения приводят к загрязнению целевого продукта побочными соединениями и повышению рацемизации. Различные аспекты карбодимидного синтеза пептидов рассматриваются во многих обзорах [1-6].

При взаимодействии промежуточного соединения (3) с аминокомпонентом образуются пептид (4) и *N,N'*-замещенная мочевина (5):



Из большого числа изученных карбодимидов наиболее подходящим оказался *N,N'*-дипилогексилкарбодимид (6), который был введен в практику пептидного синтеза Штаном и Хессом [14]:



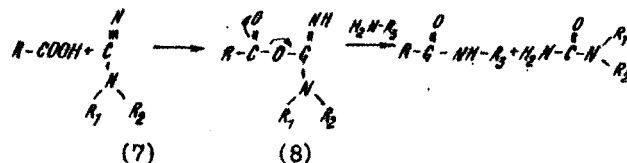
Вторым продуктом реакции ДПГК с аминокомпонентом является дипилогексилмочевина, которая плохо растворяется в органических растворителях и легко отделяется фильтрованием. Синтез пептидов ДПГК-методом идет с высокими выходами (70-90 %), но может сопровождаться значительной рацемизацией и нежелательными побочными реакциями. Так, реакция ацилпептидов с эфирами аминокислот или пептидов в присутствии ДПГК сопровождается значительной рацемизацией, а введение в полипептидную цепь остатков глутамина или аспарагина часто сопровождается образованием нитрилов. Широкое применение нашел карбодимидный метод при синтезе активированных эфиров защищенных аминокислот.

Введение в практику карбодимидного метода "водорастворимых" конденсирующих средств, например *N*-циклогексил-*N*-(2-морфолинил-4-этил)-карбодимид или *N*-циклогексил-*N*-(*p*-диметиламиноциклогексил)-карбодимид, значительно упростило очистку пептидов, поскольку соответствующие мочевинны легко растворяются в воде или водных растворах кислот.

Карбодимидный метод нашел широкое распространение в классическом и твердофазном методах синтеза пептидов. При твердофазном ме-

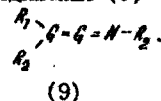
тоде синтеза пептидов используют *N,N'*-диизопропилкарбодимид, так как соответствующая мочевина лучше растворяется в органических растворителях и ее проще отделить от полимерного носителя.

Производные цианамида. Активация карбоксильной группы *N*-защищенных аминокислот при помощи цианамида во многом близка процессу, происходящему при ДПГК-методе. Реакция *N,N'*-диалкилцианамидов с аминокислотой приводит к образованию активированного соединения (8), которое реагирует далее с аминокислотой и дает пептид:

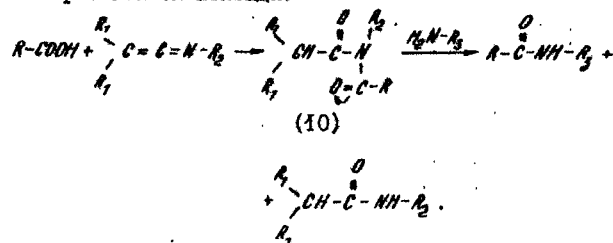


Этот метод широкого распространения не получил.

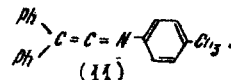
Кетенимины. Аналогично карбодимидам реагируют с карбоновыми кислотами непредельные соединения (9) - кетенимины:



При взаимодействии кетениминов с *N*-защищенной аминокислотой образуется промежуточный продукт (10), который реагирует с аминокислотой с образованием пептида:

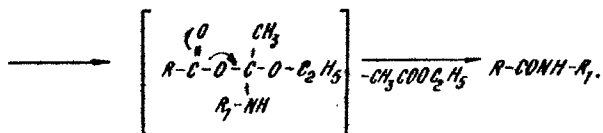


В качестве конденсирующего средства был испытан дифенилкетен-*p*-толилмин [16] (11)

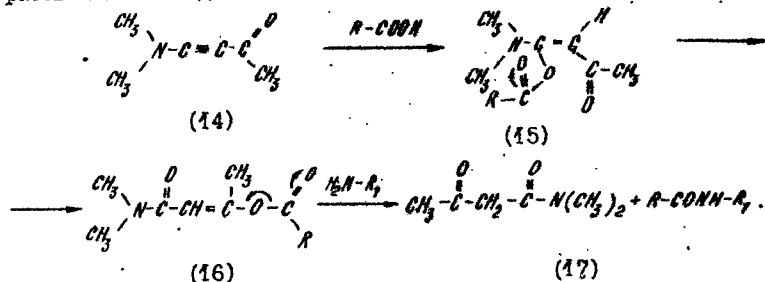


Данный метод широкого распространения не получил.

Производные ацетилен. 1. 3-токсикацетилен. В 1955 г.

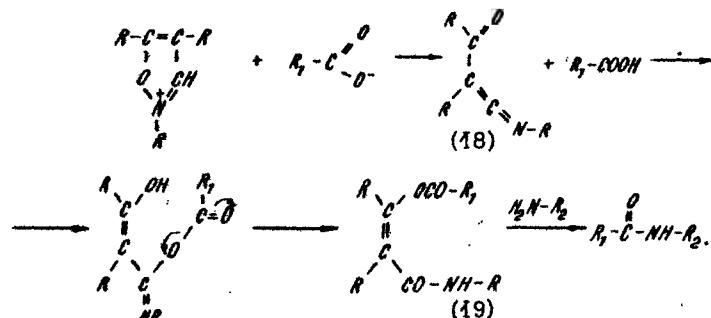
$$\begin{array}{c}
 \text{O} \\
 \parallel \\
 \text{R}-\text{C}-\text{OH}
 \end{array}
 + \text{CH}=\text{C}-\text{O}-\text{C}_2\text{H}_5 \longrightarrow
 \begin{array}{c}
 \text{O} \quad \text{CH}_3 \\
 \parallel \quad \diagup \\
 \text{R}-\text{C}-\text{O}-\text{C} \\
 \diagdown \quad \parallel \\
 \text{H}_2\text{N}-\text{R}_1 \quad \text{OC}_2\text{H}_5
 \end{array}
 \longrightarrow
 \begin{array}{c}
 \text{O} \quad \text{CH}_3 \\
 \parallel \quad \diagup \\
 \text{R}-\text{C}-\text{O}-\text{C} \\
 \diagdown \quad \parallel \\
 \text{H}_2\text{N}-\text{R}_1 \quad \text{OC}_2\text{H}_5
 \end{array}
 \quad (12)$$


2. 4 - Диметиламино - 3 - бутин - 2 - он. Это конденсирующее средство было предложено недавно Гейсом 187. При взаимодействии реагента с карбоксильным компонентом образуется енольный эфир (15), который затем перегруппировывается в более стабильное оседление (16). Последнее способно ацилировать аминокомпонент с образованием пептида:



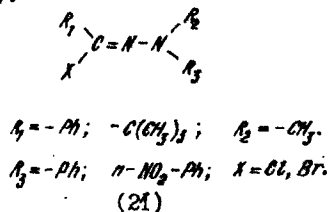
20

Соли изоксазолия. Для активации карбоксильной группы α -замещенных аминокислот Вудвортом и соавт. [21] предложены соли изоксазолия. При действии оснований на α -алкилизоксазолиевые соли раскрывается гетероцикл и образуются кетокетенимины (18). Последние реагируют с карбоксильным компонентом, превращаясь в енольные эфиры (19), которые ацилируют α -группу аминок компонента с образованием пептида:

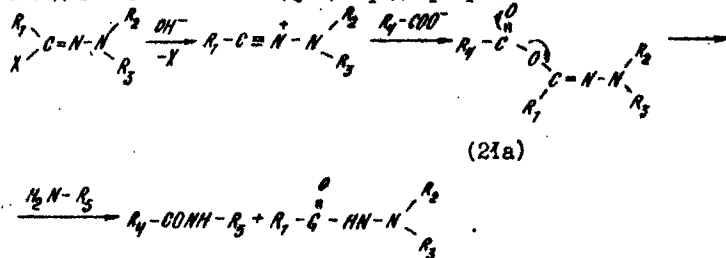
CN1C(=O)C(=O)C1c2ccccc2
(20)

Имидогалогениды: Хегарти и соавт. [22] предложили новые реагенты для образования пептидной связи — имидогалогениды (21).

По структуре продукты их взаимодействия с аминокислотами близки к виниловым эфирам (21a):



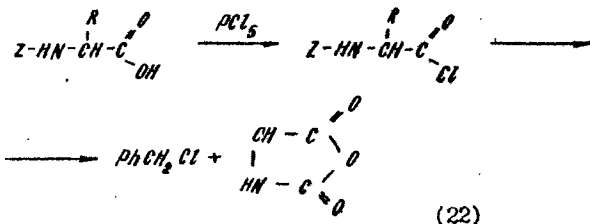
Соединения (21) получают из замещенных гидразидов и PCl_5 . При синтезе пептидов имеет место следующий ряд превращений:



1.2.2. Смешанные ангидриды

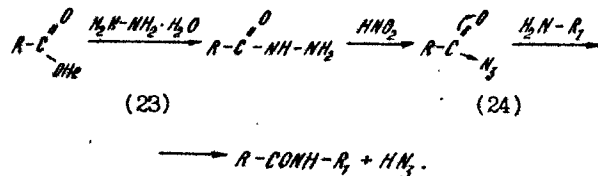
Смешанные ангидриды с неорганическими кислотами

Хлорангидридный метод. Этот метод, предложенный в 1903 г. Э.Фишером, — один из наиболее старых способов синтеза пептидов. Его недостатком является то, что образование пептидов сопровождается полной рацемизацией. Хлорангидриды защищенных аминокислот образуются при действии тионилхлорида или пентахлорида фосфора на карбоксильный компонент, но хлорангидриды бензилоксикарбониламинокислот — нестойкие соединения, которые превращаются в *N*-карбоксангидриды (22) (NCA). Этот способ является препаративным методом получения NCA:

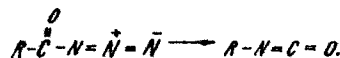


Азидный метод. Предложенный Курциузом в 1902 г. [46] азидный метод на протяжении 80 лет остается важнейшим способом конденсации при синтезе пептидов. Долгое время считалось, что азидная конденсация фрагментов пептидов протекает без рацемизации. Однако в 1970 г. было показано, что при конденсации пептидных блоков в присутствии избытка триэтиламина рацемизация идет; она особенно растет, если C-концевым остатком является гистидин. При тщательном контроле условий реакции и применении *N*-этилморфолина вместо триэтиламина азидный метод дает минимальную рацемизацию.

Азиды (24) защищенных аминокислот и пептидов можно легко получить из соответствующих гидразидов (23). Синтез последних соединений из метиловых, этиловых или бензиловых эфиров *N*-защищенных аминокислот и пептидов также не представляет большого труда. Ниже дана схема получения азидов и превращение последнего в пептид:

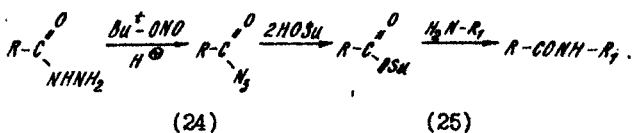


На каждой из трех стадий: синтез гидразида, получение азидов и образование пептида — могут иметь место побочные реакции. Так как защищенные гидразиды (23) весьма стабильные соединения, на этапе их синтеза меньше всего можно опасаться нежелательных процессов. Напротив, азиды нестабильны и их вводят в конденсацию немедленно. При их получении могут происходить образование амида вместо азидов (24), нитрозирование остатка триптофана и превращение метионина в метионинсульфоксид [4]. В водных растворах имеет место также перегруппировка Курциуса, т.е. превращение азидов в изоцианаты:



Если получение азидов из гидразидов (23) вести в модификации Хонзля и Рудингера [24], т.е. в безводном органическом растворителе действием трет-бутилнитрита при избытке хлористого водорода или трифторуксусной кислоты, то побочные реакции значительно подавляются, а выход пептидов оставляет 40–70 % и более. В настоящее время азидную конденсацию проводят почти исключительно этим способом.

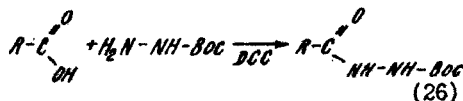
Интересной разновидностью азидного метода является способ Хиршмана и сотр. [47], заключающийся в использовании азидной конденсации для синтеза активированных эфиров. К азиду (24) добавляют



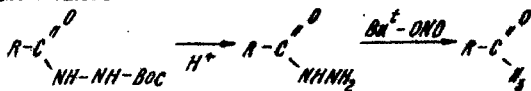
(25)

2 моль-эквивалента *N*-ооксусуцинимиды и выдерживают 12 ч; образовавшийся сукцинимидный эфир (25) вводят в реакцию с аминокислотой. Эта модификация позволяет получать более чистые пептиды и в большем количестве.

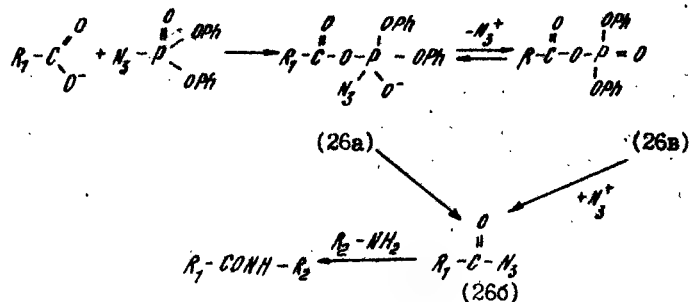
Ряд усовершенствований разработан в синтезе гидразидов пептидов. Поскольку скорость реакции гидразинолиза резко падает при увеличении длины пептидов, было предложено сначала синтезировать защищенные гидразиды аминокислот (26) и использовать их для наращивания пептида. В нужный момент отщепляют защитную группу и образовавшийся



гидразид превращают в соответствующий азид для последующего образования пептидной связи:



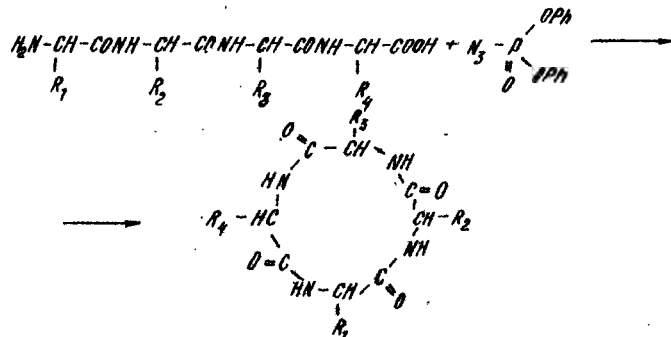
В 1974 г. Шiori и Ямада предложили новый реагент, активирующий карбоксильную группу, превращая ее в ацилазид — дифенилфосфоразид [51]. Возможно, реакция протекает через образование промежуточного продукта (26а), который в результате внутримолекулярной перегруппировки дает ацилазид (26б):



Однако продукт (26а) может находиться в равновесии со смешанным ан-

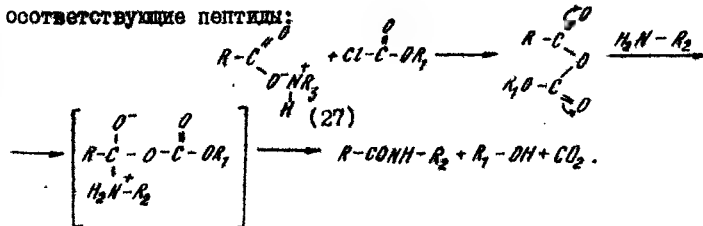
гидридом (26в), который атакуется азид-ионом и также превращается в ацилазид (26б). Авторы не исключают, что в реакцию с аминокислотой могут вступать не только соединение (26б), но и промежуточные (26а) и (26в) [52].

Конденсация пептидов дифенилфосфоразидным методом протекает без рацемизации. Кроме того, при использовании этого метода не нужно блокировать боковые функциональные группы серина, треонина, тирозина и гистидина [52]. Реагент используется для ступенчатого синтеза пептидов и конденсации фрагментов [53]. Дифенилфосфоразид является также хорошим реагентом для получения циклопептидов [54]:



Метод смешанных ангидридов с угольной кислотой. Один из распространенных методов создания пептидной связи, вошедший в практику синтеза пептидов под названием "метода смешанных ангидридов", основан на использовании смешанных ангидридов аминокислот с моноэфирами угольной кислоты (27). Он был предложен в 1951 г. одновременно несколькими группами исследователей: Виландом и Бернхардом [25], Буассона [49] и Вагтхоном [50]. Простота эксперимента, высокие скорости реакций и чистота продуктов делают этот метод весьма ценным способом получения пептидов.

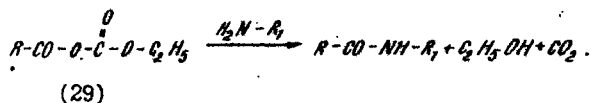
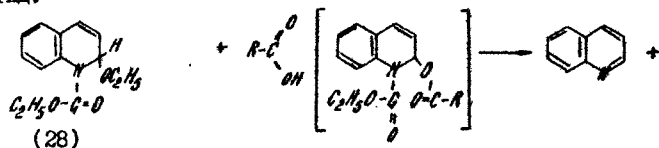
При обработке триалкиламмониевых солей защищенных аминокислот эфирами хлоругольной кислоты образуются смешанные ангидриды (27), которые с высокими выходами реагируют с аминокислотой, образуя соответствующие пептиды:



Продуктами этой реакции наряду с пептидами являются спирт и углекислота. При работе по методу смешанных ангидридов возможны побочные реакции, например расщепление ангидрида (27) в нежелательном направлении, происходящее при атаке нуклеофила по углеродному атому карбонильной группы угольной кислоты. Степень этой реакции зависит от используемого растворителя, природы заместителя угольной кислоты. Так, применение разветвленного изобутилхлорформата вместо этилхлорформата снижает образование побочных продуктов. Метод смешанных ангидридов нельзя применять для конденсации фрагментов. В этом случае рацемизация весьма значительна.

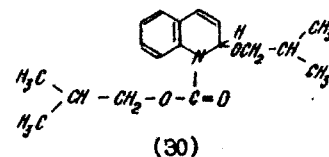
В последнее время на основе метода смешанных ангидридов разработана методика быстрого синтеза пептидов - ПСА-метод [55], т.е. метод последовательного синтеза пептидов с использованием избытка смешанного ангидрида (ЗЕМА).

Метод с использованием ЭДХ. Вместо классического варианта синтеза смешанных ангидридов в 1968 г. Беллеу и Малеком [26] был введен новый конденсирующий реагент *N*-этилоксикарбонил-2-этилокси-1,2-дигидрохиолин (ЭДХ), соединение (28), который в короткое время стал весьма популярным при синтезе пептидов. При взаимодействии реагента (28) с карбоксильным компонентом образуется смешанный ангидрид (29), который при взаимодействии с аминокислотным компонентом образует пептид:

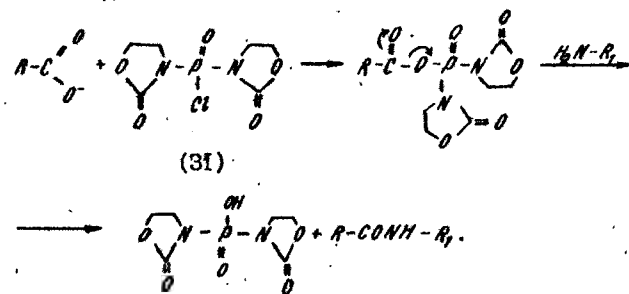


Другими продуктами реакции являются хиолин, этиловый спирт и углекислый газ, которые легко могут быть удалены. Выход пептидов достаточно высок. При использовании ЭДХ для конденсации фрагментов имеет место рацемизация.

Вместо ЭДХ при синтезе пептидов аналогично можно использовать реагент (30), 1-изобутилоксикарбонил-2-изобутилокси-1,2-дигидрохиолин (ИДХ) [56]:

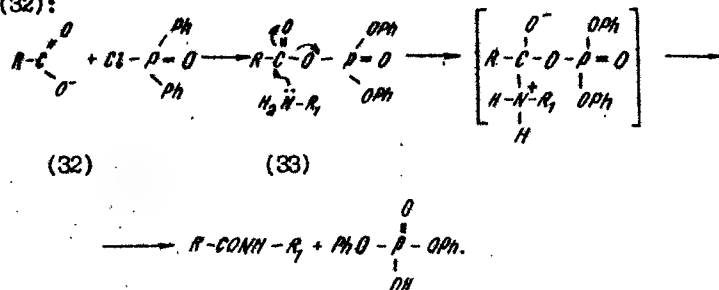


БФХ-хлорид [28]. В качестве хорошего конденсирующего реагента для ацилирования опиртов и аминов карбоновыми кислотами недавно был предложен *N,N*-бис(2-оксо-3-оксазолидин)-фосфоридаминоклорид (БФХ-хлорид), соединение (31). При его взаимодействии с анионом кислоты образуется смешанный ангидрид производных аминокислоты и замещенных фосфорной кислоты. Это соединение способно ацилировать опирты и амины с высоким выходом:



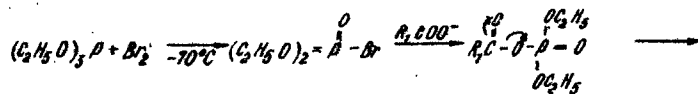
Соединение (31) нетоксично.

Дифенилхлорфосфат. Для образования смешанных ангидридов *N*-защипленных аминокислот и производных фосфорной кислоты (соединение (33)) Виланд и Бернхард [25] предложили использовать дифенилхлорфосфат (32):



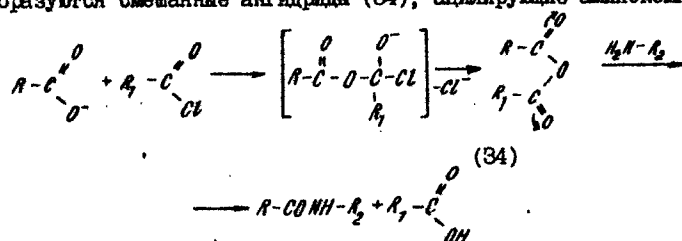
В этой схеме дифенилхлорфосфат - конденсирующий агент.

Горещкая и соотр. [27] для тех же целей применила диэтилобромфосфат:

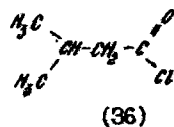
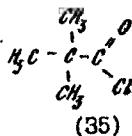


Выход пептидов составляет 85-92 %. В практике пептидного синтеза реагент широкого применения пока не нашел.

Смешанные ангидриды с органическими кислотами. При взаимодействии солей защищенных аминокислот с хлорангидридами карбоновых кислот образуются смешанные ангидриды (34), ацилирующие аминокомпонент:



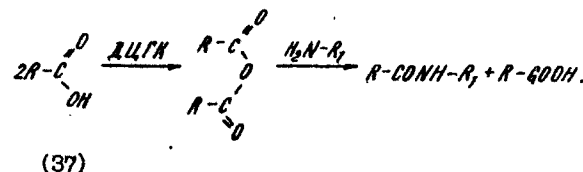
Основными побочными процессами при использовании соединений (34) являются реакция диспропорционирования и расщепление смешанного ангидрида из-за атаки аминокомпонента по карбонильному атому углерода аминокислоты или по углеродному атому карбоновой кислоты. Показано, что если использовать для синтеза пептидов хлорангидриды карбоновых кислот с разветвленными радикалами, например хлорангидрид триметилуксусной (35) или изовалериановой (36) кислот, то эти побочные процессы идут незначительно из-за стерических препятствий [29, 57, 58]



Смешанные ангидриды *N*-защищенных аминокислот или пептидов с бензолсульфокислотой приводят к полной рацемизации. Однако использование *N*-метилморфолина в качестве основания вместо триэтиламина в десятки раз снижает ее. Применение смешанных ангидридов на основе соединений (35) и (36) позволяет получать оптически чистые пептиды даже при конденсации сегментов [59].

Симметричные ангидриды. Симметричные ангидриды *N*-защищенных

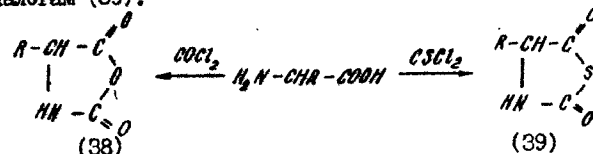
аминокислот получены Вейгандом и соотр. в 1957 г. [60]. Преимуществом этих соединений перед смешанными ангидридами является однозначность их расщепления при действии нуклеофильного агента, а недостатком - то, что в синтезируемый пептид включается лишь половина ациламино-кислоты:



Симметричные ангидриды (37) получают в основном при действии 1 моль-эквивалента $AlCl_3$ на 2 моль-эквивалента защищенной аминокислоты. Они также образуются, если в качестве конденсирующего средства использовать этоксиацетилен. Многие симметричные ангидриды являются достаточно устойчивыми соединениями. Некоторые из них получены в кристаллическом виде, но, как правило, соединения типа (37) из раствора не выделяют. В последнее время симметричные ангидриды находят широкое применение в твердофазном методе синтеза пептидов; здесь они являются, по-видимому, лучшими реагентами для образования пептидной связи.

Бенойтон и соотр. [61] показал, что симметричные ангидриды можно использовать для синтеза в водно-органических смесях. Выход пептидов оставляет более 90 %.

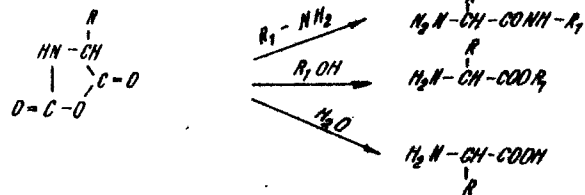
N-Карбоксиангидриды. *N*-Карбоксиангидриды аминокислот (оксазолидин-2,5-дионы), соединения (38), впервые получены Лейксом в 1906 г. [62]. Их легко можно синтезировать при действии фосгена на аминокислоту; обработка аминокислот тиофосгеном приводит к соответствующим тиованалагам (39):



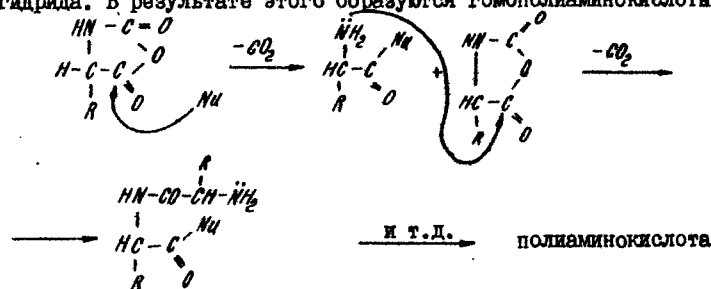
N-Карбоксиангидриды образуются также из карбобензоксаминаминокислот при действии хлоритого тионилла за счет термического разложения промежуточно образующихся хлорангидридов КВЗ-аминокислот.

С теоретической точки зрения идеальными полупродуктами для синтеза пептидов могли бы быть такие соединения, у которых *N*-защитная группа одновременно активирует карбоксильную группу и удаляется при образовании пептидной связи. *N*-Карбоксиангидриды до некоторой сте-

пени удовлетворяют этому требованию, так как при действии нуклеофильных агентов имеют место превращения, указанные на схеме:



При раскрытии цикла и отщеплении CO_2 образуется новая нуклеофильная NH_2 -группа, способная реагировать с другой молекулой N -карбоксиангидрида. В результате этого образуются гомополиаминокислоты:



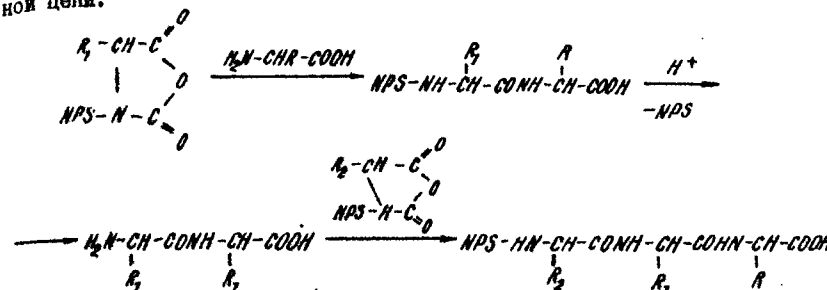
Здесь Nu - нуклеофил-затравка (амин или вода). N -Карбоксиангидриды являются лучшими реагентами для синтеза гомополиаминокислот и сополимеров аминокислот [63].

В 1966 г. Хиршман с остр. [64] показал, что в строго контролируемых условиях N -карбоксиангидриды можно использовать для ступенчатого наращивания полипептидной цепи. Синтез ведут при pH 10,2 и 0-2 °C при мощном перемешивании. Конденсация проходит за несколько минут. Таким образом, было получено несколько коротких пептидов с довольно высоким выходом, которые затем использовали для синтеза рибонуклеазы [30].

Аналогично N -карбоксиангидридам используют тиозолидин-2,5-дионы (39). В этом случае побочные реакции протекают в меньшей степени, поскольку образующиеся при аминолизе тиокарбаминовые кислоты являются более устойчивыми соединениями.

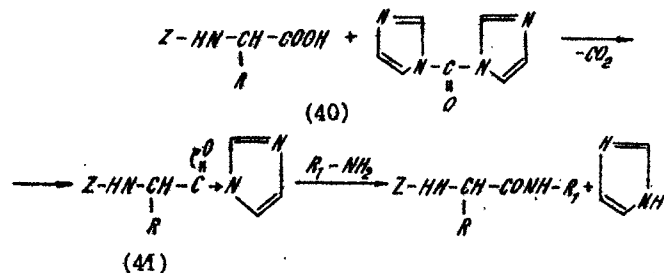
Для более широкого применения в практике пептидного синтеза рекомендуют видоизмененный способ, при котором N -карбоксиангидриды превращают в их $N\beta$ -производные [66]. Благодаря такой модификации метода устраняется опасность нежелательной полимеризации HSA

и появляется возможность более контролируемого наращивания пептидной цепи:

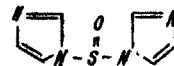


1.2.3. Карбонилдимидазольный метод

В 1958 г. Андерсон и Пол [32] предложили для образования пептидной связи новый реагент - N, N' -карбонилдимидазол (40). При взаимодействии с N -защищенными аминокислотами соединение (40) дает активированный амид (41). Последний легко реагирует с аминокислотным компонентом с образованием пептидов:



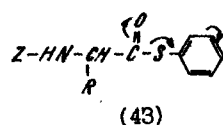
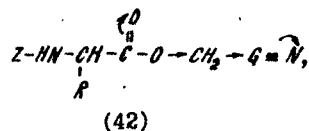
Реакция протекает быстро, почти без рацемизации. Реагент нередко применяют для синтеза пептидов. Аналог соединения (40), N, N' -тионилдимидазол был предложен Виландом [67] для синтеза пептидов:



1.2.4. Метод активированных эфиров

В начале 50-х годов две группы исследователей предложили принципиально новый способ активации карбоксильной группы, заключающийся в использовании сложных эфиров, содержащих электроакцепторные

группы. Виланд [34] изучал возможности тиофениловых эфиров защищенных аминокислот [43], Швицер с остр. [33] использовал цианметилловые эфиры типа (42)



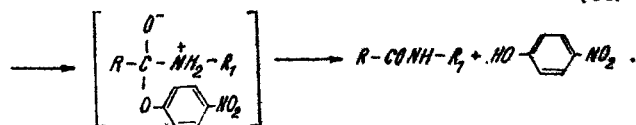
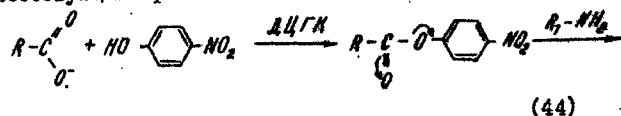
Во втором случае активация карбоксильной группы объясняется индукционным эффектом цианогруппы; реакционная способность тиофениловых эфиров увеличивается из-за наличия π -электронной системы бензольного кольца. Введение в ароматическое кольцо электроноакцепторных заместителей, таких как $-NO_2$, $-CN$, $-CF_3$, Cl , F и др., должно усиливать этот эффект. Эфиры типа (42) и (43) вскоре перестали применять из-за сравнительно жестких условий их аминолиза, и им на смену пришли активированные эфиры на основе замещенных фенолов.

Замещенные фенольные эфиры. p -Нитрофениловые эфиры (44) были предложены Бодански в 1955 г. [68] и быстро приобрели большую популярность благодаря доступности, высокой реакционной способности и устойчивости при хранении. С использованием их удалось получить достаточные крупные пептиды путем ступенчатого наращивания полипептидной цепи с C -конца [69].

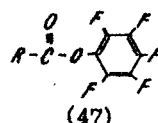
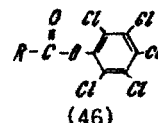
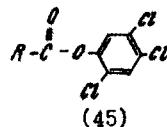
Показано, что реакционная способность p -нитрофениловых эфиров заметно возрастает при добавлении к реакционной смеси 1,2,4-триазола [70]. Очень хорошим катализатором является 1-оксибензотриазол в ДМФА, но не в ТГФ [71].

В последние годы в связи с появлением более активных эфиров p -нитрофениловые эфиры стали применять лишь для введения остатков глутамина и аспарагина, которые могут дегидратироваться при использовании карбодиимидного метода.

p -Нитрофениловые эфиры, как и большинство других активированных эфиров, получают при взаимодействии защищенных аминокислот и соответствующего фенола с добавкой ДЛГК:

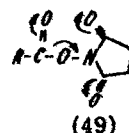
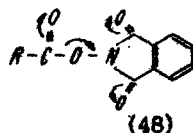


Из других эфиров этого типа для синтеза пептидов широко применяются 2,4,5-трихлорфениловые (45) [72], пентахлорфениловые (46) [73] и пентафторфениловые эфиры (47) [74-75].



Высокая реакционная способность пентахлорфениловых эфиров побудила Кипфалуди с остр. [75] использовать в качестве активированных эфиров пентафторфениловые производные типа (47) и испытать их пригодность для синтеза пептидов. Оказалось, что указанные эфиры - кристаллические соединения, растворимые в органических растворителях; они активнее других ариловых эфиров и не дают рацемизации при конденсации фрагментов. На основе ПФФ-эфиров разработан быстрый метод синтеза пептидов (см. раздел 1.3.10). Вариантом метода ПФФ-эфиров является применение "комплекса π ", т.е. комплекса пентафторфенола с ДЛГК - весьма эффективного реагента для создания пептидной связи [75].

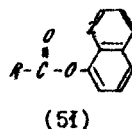
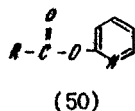
Замещенные гидросилиламины. Активированные эфиры на базе замещенных гидросилиламинов (48) были впервые получены Неффенсом и Тессеом [38] в 1961 г. исходя из N -оксифталмида:



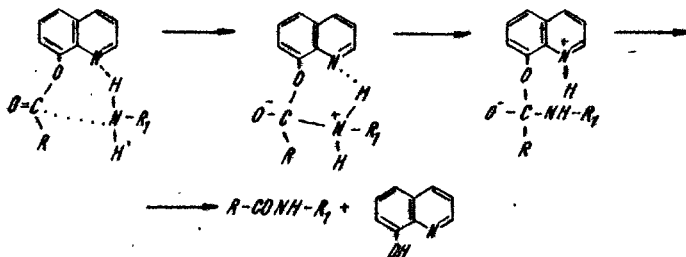
Эти эфиры оказались весьма реакционноспособными соединениями, но вскоре были вытеснены более доступными N -оксисукцинимидными эфирами (49), предложенными в 1963 г. Андерсоном [39].

Две карбонильные группы в гетероциклическом ядре значительно снижают электронную плотность на атоме углерода CO -группы аминокислоты, что значительно облегчает атаку нуклеофилами. Легкость получения N -оксисукцинимидных эфиров (49) в кристаллическом виде, отсутствие рацемизации пептидов при их использовании, высокая реакционная способность эфиров (49) и растворимость в воде продукта реакции - N -оксисукцинимиды сделали активированные N -оксисукцинимидные эфиры чрезвычайно популярными реагентами для создания пептидной связи.

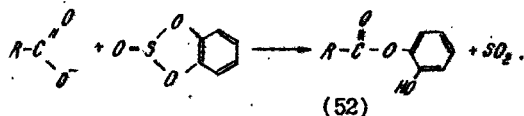
Из других активированных эфиров следует обратить внимание на группу соединений, повышенная реакционная способность которых обусловлена внутримолекулярным катализом. Это, в частности, производные 2-оксипиридина (50) и 8-оксихинолина (51)



Кинетические исследования аминолиза 8-оксихинолиновых эфиров позволили предложить следующий механизм реакции:



Внутримолекулярный катализ проявляется в неполярных растворителях (хлористый метилен, хлороформ и т.д.) и менее выражен в растворителях типа ДМФА. Этим эффектом объясняется достаточно высокая активность пирокатехиновых эфиров (52) [76], которые могут быть легко получены из замещенных аминокислот и о-фениленсульфата:

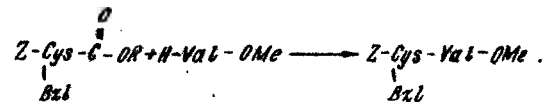


Если в ароматическое ядро ввести несколько заместителей, один из которых несет положительный или отрицательный заряд, то можно создать активированные эфиры, растворимые в воде или в водно-органических смесях. В частности, такой подход привел к созданию водорастворимых 2-нитро-4-сульфофениловых активированных эфиров (53) [77-79]. Эти соединения легко получают при взаимодействии *N*-защипенной аминокислоты с натриевой солью 2-нитро-4-сульфофенола в присутствии ДПГК в растворе ДМФА:



Эфиры (53) можно использовать для создания пептидной связи в водной среде [77-79].

Реакционная способность активированных эфиров определяется кислотностью гидроксильной группы соответствующих фенолов. Установлено, что существует связь между константой диссоциации замещенных фенолов и реакционной способностью соответствующих активированных эфиров. Помимо этого фактора на скорость ацилирования аминокислоты влияет также степень пространственного экранирования электрофильного центра за счет введения заместителя в орто-положение к эфирной связи. Ковач с остр. [80] изучал кинетику аминолиза активированных эфиров в модельной реакции



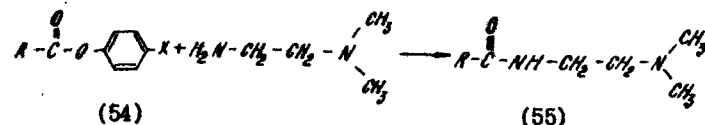
Используя пространственно затрудненные аминокислоты, они показали, что реакционная способность эфиров определяется также пространственным эффектом заместителя. Например, пентафторфениловые и пентахлорфениловые эфиры имеют близкие величины констант диссоциации OH-групп; однако скорость ацилирования аминокислоты хлор-замещенными эфирами в 20 раз ниже, чем соответствующими фтор-производными (табл. 3). Это объясняется пространственным экранированием атомами хлора, поскольку ван-дерваальсовы радиусы хлора больше, чем у атома фтора. Стерическими причинами объясняется также повышенная реакционная способность 2,4,5-трихлорфениловых эфиров по сравнению с 2,4,6-трихлорфениловыми производными, у которых два атома хлора, находясь в орто-положении, сильно затрудняют доступ аминокислоты к электрофильному центру. Аналогичный эффект проявляется у 2,6-динитрофениловых эфиров, если сравнивать их реакционную способность с соответствующими 2,4-динитрозамещенными соединениями (см. табл. 3). Следовательно, скорость ацилирования амин компонента активированными эфирами зависит от двух факторов: 1) от константы диссоциации замещенных фенолов и 2) от доступности реакционного центра атома углерода карбонильной группы для нуклеофильного агента.

Таблица 3. Сравнение реакционной способности активированных эфиров [80]

R	$k_0 \cdot 10^2$ моль ⁻¹ · с ⁻¹	Время ацилирования на 90 %, мин
	40,4±9	2,9
	18,4±3	6,3
	5,4±0,7	21
	1,73±0,2	67
	1,72±0,03	62
	0,3±0,03	385
	0,1±0,01	1088
	0,06±0,002	1856

ного выхода желаемого продукта на каждой стадии реакции. Например, ступенчатый синтез окситоцина, осуществленный Бодянки в 1959 г. на основе *p*-нитрофениловых эфиров, позволил получить биологически активное соединение с выходом 30 %, что явилось большим успехом пептидной химии. В 1967 г. этому же автору удалось синтезировать при помощи активированных эфиров 27-членный пептид [69]. Избыток активированных эфиров можно удалять после окончания реакции добавлением *N,N*-диметилаэтиландиамина (54), который впервые применил Кишфалуди при синтезе ряда модельных пептидов [81]. Соединение (54) ацилируется избытком непрореагировавшего эфира, в результате чего образуется соединение (55), способное легко растворяться в кислотах и поэтому без труда удаляемое при промывках растворами кислот:

Активированные эфиры — очень удобные реагенты для синтеза пептидов. Основным их преимуществом является то, что эти соединения можно использовать непосредственно, т.е. без предварительной активации карбоксильного компонента, как это имеет место в случае, например, смешанных ангидридов, азидного или карбонимидного методов синтеза пептидов. Кроме того, кристаллические активированные эфиры удобны при хранении и дозировании в практике пептидного синтеза. Активированные эфиры широко используются для наращивания полипептидной цепи с С-конца. Применяя избыток активированного эфира (30–50 %), можно достигнуть практически количественного

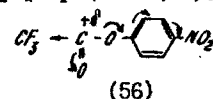


Практика пептидного синтеза показала, что при получении дипептида целесообразно использовать избыток аминокомпонента, а не активированного эфира, поскольку эфиры аминокислот обычно дешевле, чем активированные эфиры. Избыток аминокомпонента можно удалить промыванием раствором кислоты.

Установлено, что реакции активированных эфиров ускоряются добавлением триазола, имидазола или уксусной кислоты. Поэтому при использовании активированных эфиров можно применять аминокомпонент в виде ацетата, т.е. без добавления третичного основания.

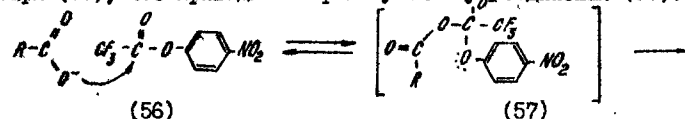
Активированные эфиры — удобные соединения для синтеза пептидов с незащищенной карбоксильной группой и незащищенным С-концевым аргинином (см. раздел 1.3).

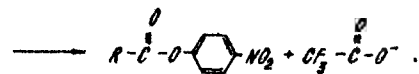
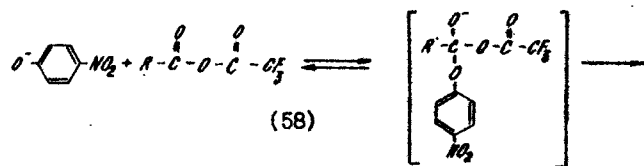
Реагенты перетерификации. В 1964 г. Сакакибара о соотр. [41] предложил для синтеза *p*-нитрофениловых эфиров защищенных аминокислот применять *p*-нитрофенилтрифторацетат (56):



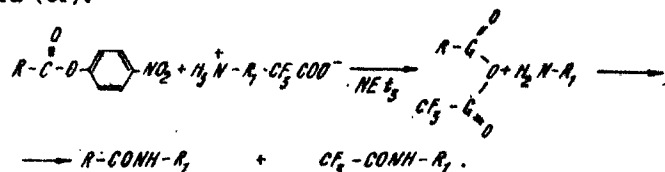
В последующие годы появилась целая серия подобных реагентов на основе *N*-оксоукцинимидов, *N*-оксофталимидов, пентахлор- и пentaфторфенолов, с трихлор-, трифторацетатными группами и остатками сульфонилов. Указанные реагенты весьма удобны для синтеза активированных эфиров: они устойчивы при хранении, легко синтезируются и в отличие от ДПЖ нетоксичны. Их можно использовать как для получения активированных эфиров, так и непосредственно для образования пептидной связи без выделения соответствующего активированного соединения.

Исследование механизма этой реакции показало, что она, по-видимому, идет не за счет перетерификации, как думали раньше, а через промежуточное образование смешанного ангидрида. Сначала анион карбоксильного компонента атакует атом углерода СО-группы реагента Сакакибары (56), что приводит к промежуточному соединению (57):





После внутримолекулярной перегруппировки (57) образуются смешанный ангидрид (58) и *p*-нитрофенол, который ацилируется смешанным ангидридом с образованием активированного эфира (59) и трифторацетата [4]. Указанный механизм подтверждается также тем, что при ацилировании реактивом Сакакибара аминокомпонента в виде трифторацетата кроме желаемого пептида (60) образуется трифторацетильное производное аминокомпонента (61):



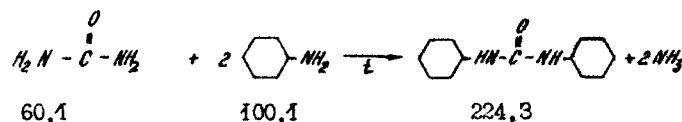
Это легко понять, если предположить, что в результате реакции сначала образуется смешанный ангидрид [4]. Подробнее о реагентах перестерификации см. обзор [358].

1.3. МЕТОДИКА СИНТЕЗА РЕАГЕНТОВ

1.3.1. Карбодимидный метод

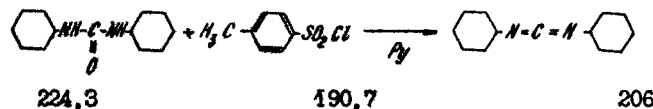
Дихлорогексилкарбодимид

Методика 1. Дихлорогексилмочевина [10]



Смесь 60 г (1 моль) мочевины и 240 г (2,4 моль) циклогексилamina в 480 мл изоамилового спирта кипятят с обратным холодильником в течение 28 ч. После охлаждения раствора осадок отфильтровывают, промывают эфиром и сушат на воздухе. Выход дихлорогексилмочевины 200 г (89 %), т. пл. 234 °С. В н. амиловом спирте выход продукта повышается до 94 %.

Методика 2. Дихлорогексилкарбодимид [10]



Раствор 200 г (0,9 моль) дихлорогексилмочевины и 300 г (1,57 моль) *p*-толуолсульфохлорида в 600 мл сухого пиридина перемешивают в течение 1 ч при 70 °С. и затем реакционную массу выливают в колбу емкостью 3 л, содержащую 1,5 кг измельченного льда. Продукт реакции извлекают эфиром. Полученные органические вытяжки фильтруют, промывают водой до pH 7,0, сушат сульфатом магния, и эфир удаляют на ротационном испарителе. Остаток перегоняют (воздушный холодильник) при 1,47 кПа, собирая фракцию, кипящую при 148-152 °С. Выход дихлорогексилкарбодимида - 152 г (82 %), т. пл. 35 °С. Продукт застывает в виде светлой воскообразной массы и может длительно храниться в холодильнике. Д и х л о р о г е к с и л к а р б о д и м и д л о в и т! Следует избегать попадания его на кожу, так как он вызывает сильную аллергическую реакцию. Все работы с ДХК необходимо проводить в вытяжном шкафу в резиновых перчатках.

Синтез пептидов карбодимидным методом

Методика 3. Общая методика синтеза пептидов.

Обычно эквимолярные количества защищенной аминокислоты, хлоргидрата, бромгидрата или бензолсульфоната аминокомпонента, третичного основания (триэтиламина, этилдиизопропиламина или *N*-метилморфолина) и ДХК растворяют в подходящем растворителе при 0 °С, перемешивают 1-2 ч и оставляют на 12 ч при комнатной температуре.

Лучшими растворителями для синтеза пептидов карбодимидным методом являются хлористый метилен, диоксан, тетрагидрофуран и ацетонитрил. Если компоненты реакции не растворяются в них, то используют ДМФА или диметилоульфоксид; при этом, однако, следует помнить,

что в полярных растворителях наблюдается более высокая рецемизация. Поскольку реакция с ДЦК экзотермична, иногда рекомендуют начинать конденсацию не при 0 °С, а при более низкой температуре (-20 °С).

Выпавшую дидицилогексилмочевину отфильтровывают и собирают, так как ее можно в дальнейшем использовать для синтеза ДЦК. В качестве примера ниже описан синтез 2-Phe-Ser-OMe.

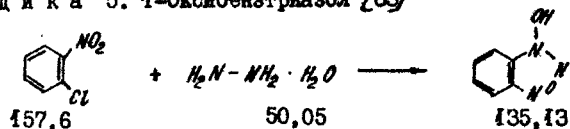
Методика 4. Метилловый эфир бензилоксикарбонилфенилаланилоэрина [82]

К раствору 9 г (30 ммоль) карбобензоксифенилаланина, 5 г (32 ммоль) хлоргидрата метилового эфира серина и 4,34 г (31 ммоль) триэтиламина в 100 мл хлористого метилена, охлажденного до -10 °С, прибавляют 8,24 (40 ммоль) ДЦК и размешивают 2 ч при этой температуре, а затем оставляют на 16 ч при 20 °С.

Выпавшую дидицилогексилмочевину отделяют фильтрованием, растворитель удаляют в вакууме, а оставшееся масло растворяют в 200 мл этилацетата и последовательно промывают 1 н. соляной кислотой, водой, 1 н. бикарбонатом натрия и 25 %-ным раствором NaCl. Органическую фазу сушат безводным сульфатом магния в течение 1 ч; когда раствор становится прозрачным, этилацетат упаривают на ротонном испарителе. Остаток растирают с петролейным эфиром до затвердения и кристаллизуют из смеси этилацетат - петролейный эфир. Выход 10,9 г (91 %), т. пл. 125 °С, $[\alpha]_D^{25} = 5,7^\circ$ (с-1, ДМА).

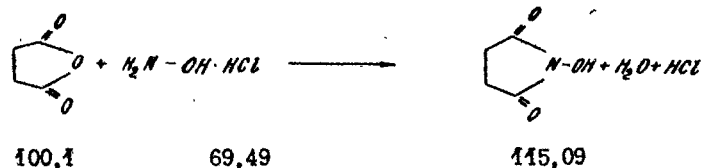
1.3.2. Синтез нуклеофильных добавок

Методика 5. 1-Оксибензотриазол [83]



Смесь 31,52 г (0,2 моль) о-хлорнитробензола и 32 мл (0,65 моль) гидразингидрата в 100 мл спирта кипятят с обратным холодильником в течение 9 ч. После охлаждения раствора спирт упаривают в вакууме до концентриции сиропа. Этот продукт растворяют в воде, экстрагируют эфиром; водную фазу отделяют и подкисляют соляной кислотой до pH 1. Выпавший осадок отфильтровывают и кристаллизуют из воды. Выход 16 г (60 %), т. пл. 157 °С. (Продукт сначала плавится примерно при 100 °С, затем затвердевает и снова плавится при 157 °С.)

Методика 6. N-Оксисукцинимид [84]

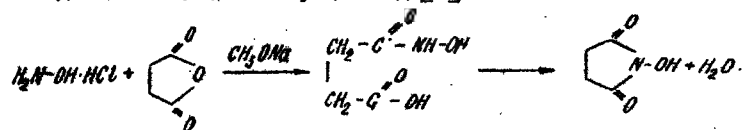


Колбу вместимостью 1 л, в которой содержится смесь хорошо высушенных компонентов реакции: 81,7 г (0,82 моль) янтарного ангидрида и 57,2 г (0,82 моль) солянокислого гидроксиламина, присоединяют к ротонному испарителю, включают вакуум водоструйного насоса, и колбу помещают на масляную баню, нагретую до 125 °С. Температуру бани повышают в течение 1 ч до 160 °С и сохраняют еще 1 ч. После этого нагревание прекращают, но колбу оставляют на бане до тех пор, пока температура не снизится до 125 °С. Образовавшуюся жидкость выливают в вытяжном шкафу тонкой струйкой в стакан, содержащий 400 мл эфира, тщательно перемешивают. Когда продукт затвердеет, эфир декантируют, а остаток нагревают с 400 мл н-бутанола, раствор фильтруют и быстро охлаждают до 0 °С. Образовавшиеся кристаллы отфильтровывают. Если осадок не образовался, то раствор упаривают досуха на ротонном испарителе, а остаток промывают сухим н-бутанолом и эфиром. Полученный продукт кристаллизуют при 89 °С. Для очистки кристаллическую массу помещают в колбу вместимостью 1 л и несколько раз обрабатывают кипящим этилацетатом порциями по 0,5 л. Этилацетат собирают и охлаждают, продукт выпадает в виде бесцветных кристаллов. Выход 59 г (67 %), т. пл. 95-96 °С.

Примечание. Если при кристаллизации из н-бутанола выпадает осадок, его также необходимо обрабатывать этилацетатом для удаления бутанола.

Ванг с соавт. [85] предложил новую методику синтеза N-оксисукцинимида, которая проще в исполнении и лучше воспроизводима, чем описанная выше методика.

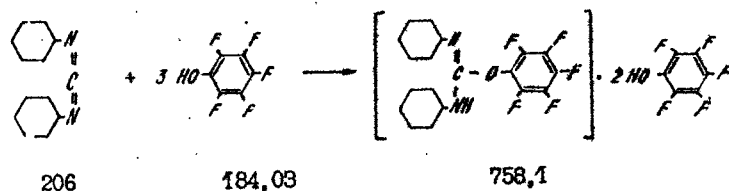
Методика 7. N-Оксисукцинимид [85]



Свежеприготовленный раствор 6,7 г (0,291 моль) натрия в 100 мл абсолютного метанола приливают к перемешиваемой суспензии 22,2 г

(0,29 моль) тонкоизмельченного хлоридата гидроксиламина. Смесь кипятят 15 мин на водяной бане, охлаждают 15 мин на бане со льдом, и образовавшийся осадок *NaCl* отфильтровывают. К полученному раствору добавляют 29,1 г (0,29 моль) янтарного ангидрида малыми порциями в течение нескольких минут при перемешивании, а затем смесь кипятят 2 ч. После отгонки избытка растворителя добавляют к вязкой *N*-оксисукцинимидной кислоте 1,2 л толуола (или коксола) и кипятят в течение 4 ч, используя насадку Дина - Старка для отделения смеси метанол - толуол - вода (около 200 мл). Горячий раствор декантируют; при стоянии из него выпадает осадок технического *N*-оксисукцинимида с т.пл. 86-92 °С. Остаток после декантации экстрагируют из реакционной колбы смесью маточного толуольного раствора и метилэтилкетона (100 мл), после концентрирования и охлаждения этого раствора получают вторую порцию продукта. Кристаллизация из этилацетата дает 16,5 г (49 %) белого чешуйчатого вещества с т.пл. 97-98 °С.

Методика 8. "Комплекс *F*" (комплекс ДПХ с пентафторфенолом) [86]

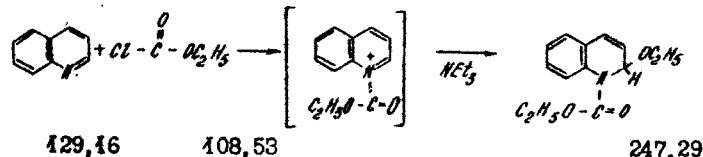


В минимальном количестве гексана растворяют отдельно каждый из следующих компонентов: 2,06 г (10 ммоль) дициклогексилкарбодимид и 5,6 г (30 ммоль) пентафторфенола. Полученные растворы объединяют, и смесь выдерживают в течение 1 ч. Выпавший осадок отфильтровывают и кристаллизуют из гексана. Выход 6,7 г (88 %), т.пл. 101,5-102,5 °С.

При синтезе пептидов прибавляют "комплекс *F*" к смеси карбоксильного к аминокомпонента в эквимолярных количествах; иногда используют небольшой избыток комплекса.

1.3.3. Синтез с использованием ЭДХ

Методика 9. 1-Этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолин (ЭДХ) [87]



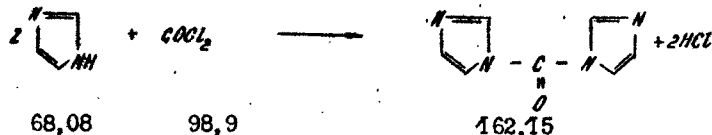
Раствор 155 мл (1,0 моль) триэтиламина в 92 мл (2,0 моль) абсолютного спирта прибавляют по каплям при -5 °С к смеси 97 мл (1,0 моль) этилхлорформата и 130 г (1,0 моль) хинолина в 300 мл сухого бензола. После перемешивания в течение 1 ч содержимое колбы промывают водой и водный слой экстрагируют несколько раз хлороформом. Соединенные вытяжки сушат сульфатом магния, хлороформ отгоняют в вакууме. После добавления к образовавшемуся маслянистому остатку 20 мл эфира вся масса затвердевает. Бесцветный продукт отфильтровывают, промывают охлажденным эфиром и сушат. Выход 140 г (57 %), т.пл. 63,5-65 °С. После выдерживания маточного раствора в холодильнике в течение ночи можно выделить еще 25 г продукта. Общий выход 165 г (66 %).

Методика 10. Этиловый эфир бензилэтоксикарбонилаланил-глицина [26]

К раствору 0,67 г (3 ммоль) бензилоксикарбонилаланила и 0,42 г (3 ммоль) этилового эфира глицина в 25 мл тетрагидрофурана прибавляют 0,74 г (3 ммоль) ЭДХ и смесь перемешивают 3 ч при 25 °С. После удаления растворителя в вакууме остаток кристаллизуют из смеси этилацетат - петролейный эфир. Выход 0,85 г (90 %).

1.3.4. Карбонилдиимдазольный метод

Методика 11. *N,N'*-Карбонилдиимдазол [32]



2,2 л абсолютного бензола перегоняют над 10 г гидрида кальция, собирая дистиллят в хорошо высушенную трехгорлую колбу вместимостью 3 л, которая содержит 112 г (1,65 моль) имидазола. Суспензию имидазола размешивают при нагревании до полного его растворения. В полученный раствор пропускают 38,6 г (0,4 моль) сухого фосгена,

при этом образующийся солянокислый имидазол выпадает в осадок. Для удаления избытка фосгена через раствор продувают сухой азот; массу охлаждают до 30 °С и оставляют до тех пор, пока жидкость не станет прозрачной (10–24 ч), после чего колбу нагревают до 50 °С и жидкость фильтруют. Бензол частично отгоняют на ротационном испарителе, а выпавший в осадок продукт отфильтровывают, сушат над фосфорным ангидридом в эксикаторе. Выход карбонилдимидазола 50,4 г (77 %), т. пл. 113–117 °С.

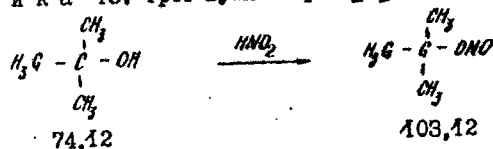
Внимание! Реагент чрезвычайно гигроскопичен; поэтому его хранят в эксикаторе над P_2O_5 .

Методика 12. Метилловый эфир бензилоксикарбонил-глутаминил-гистидина [88]

Карбобензоксиглутамин в количестве 0,14 г (0,5 ммоль) растворяют в 1,5 мл свежеперегнанного ДМФА и смешивают при исключении попадания влаги с 0,097 г (0,6 ммоль) карбонилдимидазола. Как только прекратится выделение CO_2 , добавляют раствор 0,085 г метилового эфира гистидина (0,5 ммоль) в 1 мл ДМФА и смесь оставляют на ночь при 0 °С. Образовавшийся дипептид осаждают из раствора большим количеством эфира, отфильтровывают и сушат. Выход 0,19 г (88 %), т. пл. 170–173 °С, $[\alpha]_D^{25} = 32,2^\circ$ (с=1, 1 н. раствор соляной кислоты).

1.3.5. Азидный метод

Методика 13. трет-Бутилниитрит [89]



В стакан вместимостью 0,5 л, снабженный термометром, мешалкой и капельной воронкой, помещают 74 г трет-бутилового спирта и прибавляют раствор 76 г нитрита натрия в 140 мл воды. Смесь охлаждают до 0 °С и при перемешивании добавляют из капельной воронки 90 мл концентрированной соляной кислоты так, чтобы температура раствора не поднималась выше 5 °С. Раствор переносят в делительную воронку вместимостью 1 л и встряхивают с 100 мл воды. Водный слой отбрасывают, а органическую фазу промывают 5 %-ным раствором бикарбоната натрия (3х50 мл), затем водой (3х50 мл), сушат хлорид кальция и перегоняют,

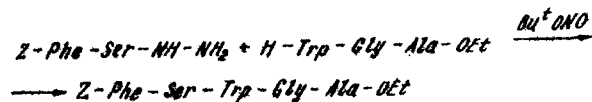
собирая фракцию, кипящую при 62–64 °С. Выход 62 г (60 %), т. кип. 63 °С. трет-Бутилниитрит представляет собой желтую подвижную жидкость, легко растворимую в органических растворителях.

Внимание! Вдыхание паров трет-бутилниитрита вызывает сильную головную боль.

Методика 14. Гидразид бензилоксикарбонилфенилаланил-серина [82]

Метилловый эфир бензилоксикарбонилфенилаланил-серина в количестве 6,8 г (17 ммоль) растворяют в 40 мл метанола, прибавляют 2 мл (40 ммоль) гидразингидрата, и раствор оставляют на 12 ч при комнатной температуре. Образовавшиеся бесцветные кристаллы отфильтровывают, промывают в 20 мл метанола, 50 мл смеси метанол – эфир (1:1) и затем 100 мл эфира. Выход 6,3 г (90 %), т. пл. 193 °С, $[\alpha]_D^{25} = 2,6^\circ$ (с=1, ДМФА).

Методика 15. Этиловый эфир карбобензоксифенилаланил-сери-триптофанил-глицин-аланина [90]



К раствору 7,8 г (19,5 ммоль) гидразида бензилоксикарбонилфенилаланил-серина в 20 мл ДМФА, охлажденному до –20 °С, прибавляют раствор 80 ммоль хлористого водорода в тетрагидрофуране и затем 2,3 мл (20 ммоль) трет-бутилниитрита. Реакционную смесь размешивают в течение 30 мин при –20 °С, прибавляют 11 мл (80 ммоль) триэтиламина (рН 8–9) и раствор аминокомпонента, который получают гидролизом 9,8 г (20 ммоль) этилового эфира бензилоксикарбонилтриптофанил-глицил-аланина.

Реакционную массу перемешивают при –10 °С в течение 1 ч и затем оставляют на ночь в холодильнике. Соли отфильтровывают, растворитель отгоняют в вакууме, а остаток растирают с 150 мл этилацетата. Этот раствор последовательно промывают 1 н. соляной кислотой, водой, 1 н. бикарбонатом натрия, 25 %-ным раствором NaCl . Органическую фазу сушат сульфатом магния, этилацетат отгоняют в вакууме, а остаток кристаллизуют из смеси спирт – вода. Выход 8,4 г (65 %), т. пл. 148–151 °С, $[\alpha]_D^{25} = 18,8^\circ$ (с=1, спирт).

Методика 16. трет-Бутилоксикарбонилгидразид бензилоксикарбонилглицина [91]



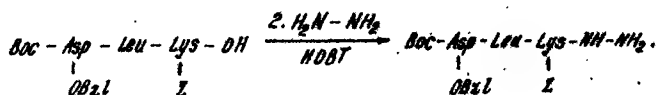
К охлажденному до 0 °С раствору 2,9 г (10 ммоль) *Z*-Gly-OH в 100 мл этилацетата добавляют 2,9 г (10 ммоль) трет-бутилоксикарбонилгидразида и 2,06 г (10 ммоль) ДПК. Реакционную массу размешивают 1 ч при 0 °С, а затем 2 ч при 20 °С. После завершения реакции в раствор добавляют несколько капель уксусной кислоты для того, чтобы разрушить избыток ДПК, выдерживают 20 мин при 20 °С и выпавшую дициклогексимочевину отфильтровывают. Прозрачный раствор промывают 1 н. бикарбонатом натрия, водой, 1 н. лимонной кислотой и снова водой. Органическую фазу сушат сульфатом магния, и этилацетат отгоняют досуха в вакууме. Остаток кристаллизуют из смеси этилацетат - петролейный эфир. Выход 2,87 г (89 %), т.пл. 81-82 °С.

Методика 17. Общий метод синтеза пептидов по Хиршману [48]

К охлажденному до -40 °С раствору 2 ммоль гидразида защищенного пептида в 15 мл ДМФА прибавляют при перемешивании 10 н. раствор хлористого водорода в тетрагидрофуране до pH 2,5, а затем 2,1 ммоль трет-бутилетрита. Реакционную массу перемешивают 1 ч при -40 °С, после чего вносят 4 ммоль *N*-оксисуццинимид и добавляют триэтиламин до pH 6,0. Смесь выдерживают 24 ч при 5 °С и еще 48 ч при 20 °С. Продукт выделяют обычным способом. Выход пептида 70-80 %.

Методика 18. Гидразид трет-бутилоксикарбонил-(δ -бензил)-аспартил-лейцил- ϵ -бензилоксикарбонил-лизина [92]

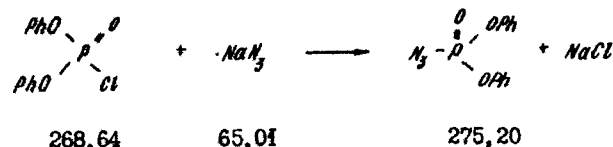
1. ДПК



Карбоксильный компонент в количестве 2 г (2,86 ммоль) растворяют в 7 мл ДМФА, охлаждают до 0 °С и прибавляют 0,108 г (3,4 ммоль) безводного гидразингидрата, затем вносят 0,963 г (6,3 ммоль) 1-оксibenзотриазола и 0,648 г (3,15 ммоль) ДПК и перемешивают 17 ч при 0 °С. После удаления выпавшей дициклогексимочевины ДМФА отгоняют

в вакууме, остаток растворяют в 150 мл этилацетата и последовательно промывают водой, 1 н. раствором бикарбоната натрия и снова водой; сушат сульфатом натрия. После удаления растворителя остаток кристаллизуют из смеси метанол - эфир. Выход гидразида 1,46 г (72 %), т.пл. 133-137 °С, $[\alpha]_D^{25} = 19,36^\circ$ (с=1, тетрагидрофуран).

Методика 19. Синтез дифенилфосфорида [51]



268,64 65,01 275,20

Смесь 56,8 г (0,21 моль) дифенилхлорфосфата и 16,3 г (0,25 моль) азиды натрия в сухом ацетоне перемешивают при комнатной температуре 21 ч. Отфильтрованный раствор концентрируют на роторном испарителе, и остаток перегоняют в вакууме (20 Па) при 152-155 °С. Получено 53,3 г (92 %) бесцветного масла.

Методика 20. Синтез этилового эфира карбобензоксиглутамил-(гамма-трет-бутил)-глицина [54]

К перемешиваемой смеси 8,44 г (25 ммоль) гамма-трет-бутилового эфира карбобензоксиглутаминовой кислоты и хлоргидрата этилового эфира глицина (3,48 г, 25 ммоль) в 80 мл ДМФА добавляют 4,08 г (25 ммоль) дифенилфосфорида в 10 мл ДМФА при охлаждении льдом, затем вносят 5,06 г (50 ммоль) триэтиламина в 10 мл ДМФА. Смесь перемешивают 4 ч при охлаждении льдом, затем 15 ч при комнатной температуре, после этого добавляют смесь этилацетат - бензол (4:1, 1 л). Полученный раствор промывают обычным образом, высушивают сульфатом магния. После удаления растворителя на роторном испарителе и кристаллизации остатка из смеси диэтиловый эфир - гексан получают 9,25 г (87 %) бесцветных кристаллов, т.пл. 67-68 °С, $[\alpha]_D^{25} = 18,5^\circ$ (с=1,04, метанол).

1.3.6. Метод смешанных ангидридов

Методика 21. Метиловый эфир бензилоксикарбонилпролил-аланина [93]

К раствору 12,4 г (50 ммоль) бензилоксикарбонилпролина в 100 мл сухого хлороформа прибавляют при -12 °С 6,9 мл (50 ммоль) триэтиламина и 6,55 мл (50 ммоль) изобутилхлорформата. Через 15 мин в ре-

акционную массу выносят 7 г (50 ммоль) хлоридата метилового эфира аланина в 50 мл ДМФА, содержащего 6,9 мл (50 ммоль) триэтиламина. Смесь размешивают 30 мин при -10°C , затем 1 ч при 0°C и оставляют на ночь при комнатной температуре. Соли удаляют фильтрованием, растворитель отгоняют в вакууме, а остаток растворяют в этилацетате и промывают. Органическую фазу сушат сульфатом магния, этилацетат отгоняют досуха на ротаторном испарителе, продукт растирают с петroleйным эфиром до образования аморфной массы. После кристаллизации из смеси этилацетат - петroleйный эфир выход продукта 8,17 г (50 %), т.пл. $72-75^{\circ}\text{C}$.

Методика 22. Изобутиловый эфир хлоруглеродной кислоты [50]

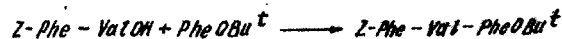


Для синтеза используют установку, которая описана для получения карбобензоксихлорида (см. гл. 2). К 148,4 г (0,15 моль) жидкого фосгена при охлаждении до -40°C медленно при перемешивании прибавляют 74,1 г (0,1 моль) безводного изобутилового спирта. Убирают охлаждающую баню, перемешивают еще 20 мин при 0°C и оставляют содержимое колбы на ночь при комнатной температуре. После продувки сухого воздуха для удаления избытка фосгена и хлористого водорода (см. раздел 2.3.1) в течение 2 ч продукт перегоняют. Выход изобутилхлорформата 95-96 г (70 %), т.кип. $123-126^{\circ}\text{C}$.

Внимание! При работе соблюдать все правила работы с фосгеном, описанные в гл. 2.

Ташнер о соавт. [57] показал, что использование для получения смешанных ангидридов хлорангидридов изовалериановой и изобутиловой кислот позволяет применять в качестве карбоксильного компонента дипептиды практически без рацемизации.

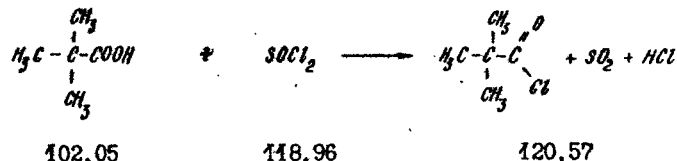
Методика 23. трет-Бутиловый эфир бензилкарбонилфенилаланилвалил-фенилаланина [57]



Раствор 80 мг (0,2 ммоль) *Z*-Phe-Val-OH в 1 мл тетрагидрофурана смешивают при -15°C с 22 мл (0,2 ммоль) *N*-метилморфолина. К раствору при размешивании прибавляют 0,21 ммоль хлорангидрида изовале-

риановой кислоты. Спустя 2 мин к охлажденному раствору добавляют 46,4 мг (0,21 ммоль) аминок компонента в 0,8 мл ТГФ. Реакционную смесь выдерживают 1 мин при -15°C и 30 мин при комнатной температуре. Тетрагидрофур отгоняют в вакууме, остаток растворяют в 6 мл этилацетата; органическую фазу промывают (3х2 мл) последовательно 5 %-ным гидрокарбонатом натрия, 2 мл воды, 2 мл 0,5 %-ной соляной кислоты, водой, сушат сульфатом магния и растворитель отгоняют в вакууме. Выход маслообразного продукта соответствует стандартной методике с использованием ДИК.

Методика 24. Хлорангидрид триметилуксусной кислоты (пивалоилхлорид) [94]



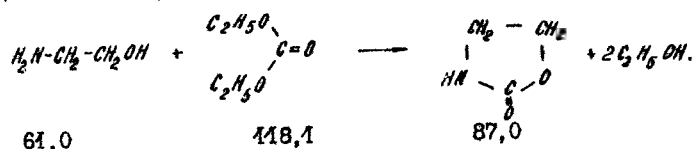
В колбе вместимостью 250 мл, снабженной обратным холодильником, нагревают до кипения смесь 35 г (0,325 моль) триметилуксусной кислоты и 27 мл (0,325 моль) тионилхлорида, кипятят в течение 5 ч, после чего реакционную смесь перегоняют на колонке эффективностью пять теоретических тарелок, собирая фракцию, кипящую при $104-106^{\circ}\text{C}$. Выход пивалоилхлорида 30,2 г (78 %), $n_D^{20} = 1,4168$.

Методика 25. Этиловый эфир тозилглицил-глицина [95]

Раствор 2,29 г (10 ммоль) тозилглицина в 20 мл хлороформа, содержащего 0,8 мл (10 ммоль) пиридина, обрабатывают при -3°C раствором 0,8 мл (10 ммоль) пивалоилхлорида в 20 мл хлороформа и выдерживают 5 мин при 0°C . К смеси при размешивании добавляют раствор 1 г (10 ммоль) этилового эфира глицина в 5 мл хлороформа, выдерживают 5 мин при 0°C , а затем 30 мин при комнатной температуре, после чего растворитель отгоняют досуха в вакууме. Остаток последовательно растирают 10 %-ной соляной кислотой, 5 %-ным бикарбонатом натрия и кристаллизуют из смеси бензол - петroleйный эфир. Выход 2,04 г, т.пл. $89-90^{\circ}\text{C}$.

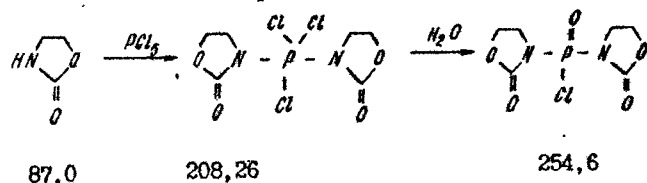
Синтез *N*-*N*-бис(2-оксо-3-оксазолидинил)-фосфодиамида хлорида

Методика 26. Оксазолидинон-2 [96]



Смесь 61 г (1 моль) аминостанола, 150 мл (1,3 моль) диэтилкарбоната и 0,5 г (0,011 моль) метилата натрия нагревают на масляной бане с перемешиванием. Когда из колбы отгонят 112 мл спирта, выделяющегося в результате реакции, нагревание прекращают; остаток после охлаждения затвердевает. Продукт кристаллизуют из 100 мл хлороформа. Выход оксазолидинона составляет 2,57 г (65 %), т.пл. 87–89 °С.

Методика 27. *N-N*-бис-2-Оксо-3-оксазолидинилфосфодиамида-хлорид (*BOP-Cl*) [28]



К раствору 34,8 г (0,4 моль) оксазолидинона-2 в 380 мл нитрометана в один прием добавляют 41,6 г (0,2 моль) пентахлорида фосфора. Реакционную смесь размешивают 4 ч при 20–25 °С, в течение 1 ч при 40–45 °С и затем охлаждают до 0 °С. Продолжая перемешивание, вносят смесь 15 мл воды и 50 мл 1,2-диметоксэтана в течение 5 мин. Нитрометан отгоняют в вакууме. Образовавшийся бесцветный кристаллический продукт отфильтровывают, промывают 1,2-диметоксэтаном и сушат при 50 °С. Выход 35,6 г (70 %), т.пл. 191–193 °С.

Методика 28. Общий метод синтеза амидов с использованием *BOP-Cl* [28]

К раствору 5 ммоль карбоновой кислоты и 0,7 мл (5 ммоль) триэтиламина в 10 мл хлористого метилена добавляют при охлаждении льдом 1,27 г (5 ммоль) *BOP-Cl*, и смесь размешивают 30 мин при 0 °С. К реакционной массе прибавляют сначала 5 ммоль соответствующего амина, а затем по каплям в течение 2 ч раствор 0,7 мл (5 ммоль) триэтиламина в 2 мл хлористого метилена при 0 °С. После этого реакционную массу разбавляют 20 мл воды и подкисляют 4 н. соляной кислотой до pH 1. Выпавший в осадок амид отфильтровывают, а органический

слой промывают раствором бикарбоната натрия, сушат сульфатом магния, упаривают и получают дополнительное количество продукта. Общий выход 88–98 %.

Синтез пептидов можно, по-видимому, осуществлять по аналогичной методике.

Методика 29. Общий метод синтеза симметричных ангидридов *N*-защищенных аминокислот [97]

К раствору 2 ммоль *N*-защищенной аминокислоты в 20 мл хлористого метилена прибавляют при охлаждении льдом 1 ммоль хлоридрата *N*-этил-*N'*-(γ -диметиламинопропил)карбонимидида, и раствор размешивают 2 ч при 0 °С. Хлористый метилен отгоняют на роторном испарителе, к остатку добавляют 25 мл этилацетата, и раствор последовательно промывают охлажденным раствором лимонной кислоты (2x10 мл), 1 н. раствором хлористого натрия, 1 н. бикарбонатом натрия и снова раствором *NaCl*. После охлаждения раствора до –5 °С выпадают кристаллы, их отфильтровывают и промывают петролейным эфиром. Выход 51–86 %. В табл. 4 отражены физико-химические свойства синтезированных симметричных ангидридов.

Таблица 4. Свойства симметричных ангидридов Вос-аминокислот

Аминокислота	Выход, %	Т.пл., °С	$[\alpha]_D^{25}$, градус (с=2, CHCl_3)
<i>L</i> -Аланин	75	95–97	–16,9
β -Бензиловый эфир			
<i>L</i> -аспарагиновой кислоты	86	Масло	–4,0
<i>L</i> -Валин	51	84–85	–4,0
γ -Бензиловый эфир			
<i>L</i> -глутаминовой кислоты	50	70–72	–27,0
Глицин	60	82–83	
<i>L</i> -Изолейцин	55	68–69	–32,8
<i>L</i> -Лейцин	83	Масло	–16,6
<i>L</i> -Метионин	73	76–78	–1,8
<i>L</i> -Пролин	80	Масло	–60,8
<i>O</i> -Бензиловый эфир	54	"	–3,5
<i>L</i> -серина			
<i>O</i> -Бензиловый эфир	69	75–77	+8,1
<i>L</i> -тирозина			
<i>L</i> -Фенилаланин	76	95–97	+19,6

Методика 30. Общий метод синтеза симметричных ангидридов *N*-защищенных аминокислот без выделения [98]

Этот способ используют для синтеза пептидов твердофазным методом. Смесь 2 ммоль Вос-аминокислоты и 1 ммоль ДПТК в минимальном количестве хлористого метилена выдерживают 20 мин при 0 °С, выпавшую в осадок дидипиклогеоксимочевину отфильтровывают, а раствор симметричного ангидрида используют для ацилирования аминокомпонента.

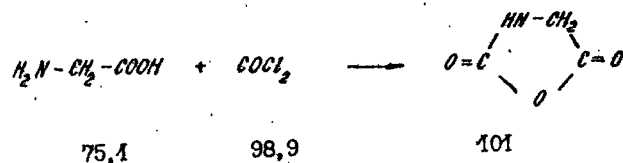
Методика 31. Синтез пептидов в смеси ДМФА - вода [61]

К раствору 1 ммоль хлоргидрата, бромгидрата или α -толуол сульфоната эфира аминокислоты или пептида в 5 мл смеси диметилформамид - вода (4:1) и 1 ммоль N -метилморфолина прибавляют при перемешивании симметричный ангидрид, и реакционную смесь выдерживают в течение ночи при 23 °С. Если используют избыток симметричного ангидрида, то спустя указанное время прибавляют 1 ммоль 1-амино-3-диметиламинопропана и размешивание продолжают 1 ч. Затем прибавляют в колбу 100 мл хлористого метилена и раствор последовательно промывают водой (2хх50 мл), 10 %-ной лимонной кислотой, водой, насыщенным раствором бикарбоната натрия и снова водой. Раствор пептида в хлористом метиле не сушат сульфатом магния, и растворитель отгоняют в вакууме. Защищенный пептид не требует дополнительной очистки и может быть использован для дальнейшего наращивания полипептидной цепи. Выход 90 %.

1.3.7. Карбоксангидридный метод

Методика 32. Общий метод получения N -карбоксангидридов аминокислот с использованием фосгена [99].

Синтез N -карбоксангидрида-глицина



В сухую трехгорлую колбу вместимостью 2 л, снабженную трубкой для подачи газа, обратным холодильником и мешалкой с силиконовым затвором, помещают тонкоизмельченную суспензию 8 г глицина в 375 мл сухого диоксана. При нагревании на водяной бане до 40 °С в реакционную смесь медленно пропускают ток фосгена в течение 4-5 ч; глицин при этом постепенно растворяется. Для удаления избытка фосгена через раствор продувают в течение 12 ч сухой воздух, затем диоксан отгоняют на ротерном испарителе при 40 °С. После добавления неболь-

шого количества сухого эфира остаток обычно кристаллизуется; кристаллы быстро отфильтровывают, промывают сухим эфиром и хранят в эксикаторе над фосфорным ангидридом. Выход 9,2 г (85 %).

Этим способом получают N -карбоксангидриды других аминокислот, однако время пропускания фосгена зависит от времени полного растворения аминокислоты (табл. 5).

Таблица 5. Свойства N -карбоксангидридов аминокислот

Аминокислота	Выход, %	Растворитель для кристаллизации	Т.пл., °С	$[\alpha]_D^{25}$, градус (с=1, ацетон)
α -Аланин			92	
α -Аспарагиновая кислота	25	-	-	-
β -Бензиловый эфир α -аспарагиновой кислоты	-	-	121	-
α -Аспарагин*	36	-	-	-
α -Валин	56,7	Гексан - этилацетат (9:1)	67-69	-44,4
Бензил- α -гистидин-НСI	-	-	187-189	-
Глицин	-	-	100	-
γ -Бензиловый эфир γ -глутаминовой кислоты	-	-	96-97	-
γ -Глутаминовая кислота	56,5	Этилацетат - гексан	83	-21,2
Бромгидрат α -гистидина*	50	-	-	-
α -Глутамин*	33	Метилэтил - кетон - гексан	270	-9,3
α -Лейцин	-	-	76-77,5	-
ϵ -Карбобензойко- α -лизин	-	-	100	-
α -Серин	42	-	82	-
ϵ -трет-Бутилоксикарбонил- α -лизин*	54,6	Ацетон - гексан	123	-17,3
α -Пролин	-	-	45	-
α -Карбобензойко- α -тирозин	-	-	101	-
α -Треонин*	49	Этилацетат - гексан	94-98	-62,7

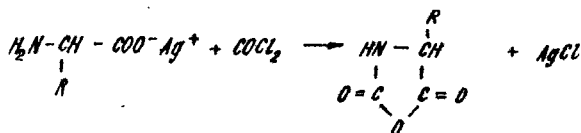
* N -Карбоксангидриды указанных аминокислот получены через серебряные соли.

Методика 33. Синтез N -карбоксангидридов аминокислот с использованием хлористого тионила [62]

Раствор 5 г бензилоксикарбониламинокислоты в 25 мл свеженерганизованного тионилхлорида нагревают при 60 °С в течение 30 мин, предохраняя реакционную смесь от попадания влаги. Избыток тионилхлори-

да удаляют в вакууме, а остаток растирают с сухим петролейным эфиром и затем кристаллизуют из смеси этилацетат - петролейный эфир.

Методика 34. Синтез *N*-карбоксангидридов аминокислот через их серебряные соли [100];
N-карбоксангидрид серина



1. Серебряная соль серина. Все операции должны проводиться в темноте. К перемешиваемому раствору 105 г (1,0 моль) 1-серина в 2,5 л воды в течение 5 мин добавляют порциями 116 г (1,1 моль) свежеприготовленного оксида серебра. Массу размешивают 1 ч, а затем добавляют 50 г активного угля и перемешивают еще 20 мин. Раствор фильтруют через целит, охлаждают, прибавляют к нему в течение 2 ч 750 мл метанола, затем в течение ночи при размешивании и охлаждении до 0-5 °С добавляют по каплям 2 л метанола. Осадок отфильтровывают, промывают метанолом и сушат в вакууме. Выход 126 г (40 %).

2. *N*-Карбоксангидрид серина. В пробирке, защищенной от света, рассчитанное количество фосгена пропускают через суспензию 42,4 г серебряной соли серина в 500 мл сухого диоксиана, после чего смесь перемешивают 1 ч. Нерастворимый осадок отфильтровывают, и раствор лиофилизируют. Остаток растворяют в минимальном объеме этилацетата, добавляют петролейный эфир до помутнения раствора. Содержимое колбы перемешивают, охлаждая на ледяной бане. Когда жидкость станет прозрачной, снова добавляют петролейный эфир до помутнения и перемешивают. Выпавший в осадок продукт отфильтровывают, промывают петролейным эфиром и сушат в вакууме. Выход 11 г (40 %), т.пл. 82 °С с разложением.

Методика 35. Общий метод синтеза пептидов через *N*-карбоксангидриды аминокислот [64]

Синтез ведут в 10-50 мл натрий-боратного буфера pH 10. Сначала аминокислоту (10 ммоль) растворяют в борной кислоте (0,45 моль) и с помощью 50 %-ного раствора едкого натра доводят значение pH на pH-метре до 10,2. Раствор охлаждают до 0 °С, добавляют в качестве эмульгатора каплю каприлового спирта, смесь переносят в миксер и

включают мешалку. Карбоксангидрид соответствующей аминокислоты прибавляют в один прием или порциями в течение 15-30 с. Одновременно из автоматической бюретки вводят раствор едкого натра, поддерживая pH среды около 10,2; обычно реакция заканчивается через 2 мин, и добавление щелочи прекращают.

При использовании *NCA* глицина, аланина и пролина, которые лучше растворимы в воде, чем *NCA* других аминокислот, синтез пептидов можно вести в колбе с магнитной мешалкой.

После окончания реакции раствор подкисляют и пептид выделяют обычным способом.

Методика 36. Пролил-фенилаланин [64]

Раствор 1,65 г (10 ммоль) фенилаланина в 350 мл боратного буфера охлаждают до 0 °С, и pH доводят до 10,2. При интенсивном размешивании в миксере к раствору добавляют 1,7 г (12 ммоль) *N*-карбоксангидрида пролина, и размешивание продолжают в течение 30 с; затем раствор подкисляют до pH 5 концентрированной серной кислотой. Кристаллы отфильтровывают, промывают водой и сушат. Выход 2,31 г (89 %), т.пл. 236-237,5 °С, $[\alpha]_D^{25} = -41,2^\circ$ (с=2, 6 н. соляная кислота).

Методика 37. Метионил-тирозин [64]

Синтез пептида ведут аналогично, но пептид выделяют иначе. После подкисления раствора до pH 5 его пропускают через колонку с активным углем, на которой пептид адсорбируется. Колонку сначала промывают 10 объемами воды, а продукт элюируют смесью уксусной кислоты с 50 %-ным ацетоном (1:3). После удаления растворителя на роторном испарителе получают дипептид. Выход 80 %, т.пл. 259-265 °С.

В табл. 6 указаны условия синтеза и выход некоторых дипептидов.

Таблица 6. Строение и условия синтеза дипептидов с использованием *N*-карбоксангидридов аминокислот* [64]

Пептид	Количество используемой аминокислоты, ммоль	Объем буфера, мл	Молярность буфера, моль	Избыток используемого <i>N</i> -карбоксангидрида, %	Выход, %	pH буфера
Val-Ser	6	1,0	40	5	98	10,2-10,0
Leu-Val	4	1,0	40	5	67	10,0-10,0
Ala-Leu	4	0,5	200	20	65	10,0
Phe-Leu	8	0,4	20	5	78	10,4-10,5
Gly-Phe	5	1,0	45	10	-	10,2
Tyr-Ser	10	1,0	125	5	52,2	10,0

Окончание табл. 6

Пептид	Количество используемой аминокислоты, ммоль	Объем буфера, мл	Молярность буфера, моль	Избыток используемого N -карбоксангидрида, %	Выход, %	pH буфера
Ala-Ser**	5	0,5	250	0	43	10,0
Trp-Leu	2,8	0,5	25	40	99	10,8
Pro-Phe	4	0,5	350	20	89	10,2
Ile-Lys	4	1,0	40	10	98	10,15-10,2
Boo						
Met-Tyr	2	1,0	20	10	80	10,2-10,6
Ala-Phe	20	1,0	200	10	98	10,6
Ile-Trp	40	1,0	100	5	97	10,0
Val-His	2	1,0	20	5	95	10,1-10,2
Leu-Phe	5	0,45	25	5	82	10,2-10,5

* Синтезированные пептиды содержат L-аминокислоты.

** Синтез этого пептида проведен на магнитной мешалке.

В 1980 г. Кирхер о соавт. [65] опубликовал детальное исследование по оптимизации синтеза пептидов N -карбоксангидридным методом. Им определены компромиссные условия реакции для минимизации образования побочных продуктов. Найденное значение pH необходимо, с одной стороны, для повышения устойчивости карбамилата, а с другой - для уменьшения анионной полимеризации. В частности, авторы применяли pH 10,2, температуру 0-3 °C и добавляли N -карбоксангидриды в твердом виде при интенсивном размешивании. Однако и эти условия не гарантируют получение гомогенных пептидов; иногда в значительных количествах возникают побочные продукты. В работе [65] показано, что при использовании больших избытков аминокислот (100-200 %) в конечном продукте содержится незначительное количество примесей, которые легко отделяются хроматографически. Этим способом было получено 12 пептидов при реакции N -карбоксангидридов со 100 %-ным избытком аминокислотного компонента с довольно хорошим выходом; целевой продукт выделяли хроматографически на кизельгеле.

Методика 38. Фенилаланил-глицин [65]

В реакционный сосуд добавляют 100 мл 0,5 н. калий-боратного буфера, pH 10,2 и 0,75 г (10 ммоль) глицина. Раствор охлаждают при перемешивании до 3 °C, доводят pH до 10,2 4 н. раствором едкого кали и после включения мешалки на полную мощность добавляют 0,96 г (5 ммоль) N -карбоксангидрида фенилаланина. Путем быстрого прибав-

ления 4 н. КОН поддерживают pH 10,2. Размешивают в течение 0,5 мин на максимальных оборотах, а затем 1,5 мин - на уменьшенных, но так, чтобы температура смеси не поднималась выше 4 °C. Затем реакционную смесь подкисляют 30 мл полуконцентрированного раствора серной кислоты до pH 3,0 в течение нескольких секунд интенсивного перемешивания, затем раствор нейтрализуют добавлением 4 н. КОН.

Полученный водный раствор упаривают досуха, и пептидный материал извлекают 300 мл горячего абсолютного метанола. После удаления растворителя в вакууме остаток растворяют в 30 мл смеси бутанол - уксусная кислота - вода (4:1:1) и пропускают через колонку с кизельгелем (72x3 см), уравновешенную этим же растворителем. Собирают фракции по 12 мл. Фракции 40-70, содержащие нужный продукт, упаривают в вакууме, и оставшееся масло оставляет медленно кристаллизоваться. Для очистки продукта его пересаживают 200 мл эфира из минимального количества метанола. Выход фенилаланил-глицина 1,05 г (94,5 % из расчета на NCA), т.пл. 265-267 °C, $[\alpha]_D^{25} = +101,5^\circ$ (с=2, вода).

По аналогичной методике получают дипептиды, указанные в табл.7.

Т а б л и ц а 7. Дипептиды, синтезированные NCA -методом при использовании 100 %-ного избытка аминокислотного компонента [65]

Пептид	Выход, %	$[\alpha]_D^{25}$, градус	Т.пл., °C
Phe-Gly	94,5	+101,5 (с=2, H ₂ O)	265-267
Phe-Val	53,0	+18,6 (с=1, 1 н. HCl)	256-258
Phe-Ile	82,0	+8,9 (с=1, H ₂ O)	256
Leu-Gly	87,1	+78,4 (с=2, H ₂ O)	243-245
Leu-Ala	84,7	+21,3 (с=5, MeOH)	250-256
Leu-Phe	70,5	+23,6 (с=0,5, H ₂ O)	128
Ile-Gly	83,9	+103,7 (с=1, H ₂ O)	265 (разложение)
Ile-Val	84,3	-14,9 (с=1, H ₂ O)	263-265

Метод синтеза с использованием о-нитрофенилсульфенил- N -карбоксангидридов аминокислот

Методика 39. Синтез о-нитрофенилсульфенил- N -карбоксангидридов аминокислот [66]

К раствору N -карбоксангидрида аминокислоты (0,1 моль) в 300 мл ТГФ, охлажденному до 0 °C на ледяной бане, при перемешивании

добавляют 19 г (0,1 моль) кристаллического о-нитросульфенилхлорида, а затем по каплям 14 мл триэтиламина. Раствор перемешивают при 0 °С еще 15 мин. Выпавшие кристаллы хлоргидрата триэтиламина отфильтровывают, а фильтрат концентрируют на ротормном испарителе при 35 °С. Маслянистый остаток кристаллизуется при добавлении *n*-гексана. Кристаллы о-нитрофенилсульфенил-*N*-карбоксиангидрида растворяют в небольшом объеме этилацетата, а нерастворившуюся часть удаляют фильтрованием. После добавления к фильтрату гексана и охлаждения его в холодильнике получают бледно-желтый осадок, его кристаллизуют из этилацетата, отделяют чистый продукт и сушат его в эксикаторе над P₂O₅. Константы полученных соединений указаны в табл. 8.

Т а б л и ц а 8. о-Нитросульфенил-*N*-карбоксиангидриды аминокислот [65]

<i>NPS-NCA</i>	Выход, %	Т.пл., °С	$[\alpha]_D^{25}$, градус, (ТФ)
L-Ala	92	176-178	+22,7 (с=1)
L-Asp(OBzl)	94	137-138	+70,8 (с=2)
L-Val	94	150-152	+16,9 (с=1)
Gly	94	168-170	-
L-Glu(OBzl)	94	Масло	+18,7 (с=2,5)
L-Ile	92	101-103	+32,9 (с=1)
L-Leu	82	97-99	+44,8 (с=1)
L-Lys(Z)	94	121-123	+23,5 (с=2)
L-Phe	92	151-153	+31,2 (с=2)

М е т о д и к а 40. Общая методика синтеза пептидов с использованием о-нитросульфенил-*N*-карбоксиангидридов аминокислот [66]

Хлоргидрат или *N*-толуолсульфонат аминокислоты (0,1 моль) растворяют в 200 мл ТФ или ацетонитрила, добавляют 14 мл (0,1 моль) триэтиламина и образующую соль удаляют фильтрованием. К полученному раствору прибавляют 0,105 моль о-нитросульфенил-*N*-карбоксиангидрида аминокислоты и перемешивают 2 ч при комнатной температуре. Растворитель упаривают на ротормном испарителе при 35 °С, оставшееся масло растворяют в 400 мл этилацетата и промывают 5 %-ным раствором лимонной кислоты, 50 %-ным раствором гидрокарбоната натрия, водой и сушат над сульфатом натрия. Раствор концентрируют на ротормном испарителе при 40 °С. Маслянистый остаток, затвердевающий при добавлении *n*-гексана, кристаллизуют из этилацетата. Выход пептидов 86-98 %.

1.3.8. Метод активированных эфиров

Паранитрофениловые эфиры

М е т о д и к а 41. *N*-Нитрофениловые эфиры *N*-защищенных аминокислот [40]

К раствору *N*-защищенной аминокислоты (1 моль) в этилацетате (для глутамина и аспарагина в качестве растворителя используют ДМФА) прибавляют при 0 °С 1,1 моль *N*-нитрофенола и 1,1 моль ДПТК, перемешивают 1 ч при 0 °С и оставляют на 20 ч при комнатной температуре. Выпавшую дидипиклогексимочевину отфильтровывают, промывают этилацетатом, а растворитель упаривают в вакууме. Остаток кристаллизуют из спирта.

В табл. 9 представлены свойства *N*-нитрофениловых эфиров *N*-защищенных аминокислот, полученных разными методами.

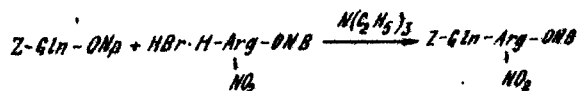
Т а б л и ц а 9. Свойства *N*-нитрофениловых эфиров аминокислот^ж

Аминокислота	Т.пл., °С	$[\alpha]_D^{25}$, градус	Растворитель
Z-L-AlaOH	79-79,5	-38,1	Этилацетат
Z-L-AspOH	158-159,5	-31,5	ДМФА
Z-L-Asp(OBzl)OH	76	-16,6	"
Z-L-Asp(OBzl)OH	86,5-87,5	+1,5	Хлороформ
Z-L-Cys(Bzl)OH	93-94	-43	ДМФА
Z-L-GlnOH	155-156	-24	"
Z-L-Glu(OBzl)OH	114-115	-32,5	Метанол
Z-L-Glu(OBu)OH	60-61	-33,5	"
Z-GlyOH	128	-	"
Z-L-IleOH	60-62	-15,5	ДМФА
Z-L-LeuOH	95	-33,5	"
Z-L-Lys(Boc)OH	88-91	-14,8	Ацетон
Z-L-MetOH	96-97	-33,8	ДМФА
Z-L-PheOH	126-127	-24,7	"
Z-L-ProOH	94-96	-68	"
Z-L-Ser(Bzl)OH	55-57	-12	"
Z-L-ThrOH	93-95	-24	"
Z-L-TrpOH	105	-4,5	"
Z-L-Tyr(OBzl)OH	148-150	-9,0	"
Z-L-ValOH	66-67	-25	"
Boc-L-AlaOH	83	-52,5	"
Boc-L-Arg(NO ₂)OH	126-128	-30	"
Boc-L-AspOH	178-180	-36	"
Boc-L-Asp(OBzl)OH	104-106	-36	"
Boc-L-Cys(Bzl)OH	95-96	-37,5	"
Boc-L-GlnOH	154-155	-35	"
Boc-L-Glu(OBzl)OH	123	-33,5	"
Boc-GlyOH	70-71	-	"
Boc-L-His(Boc)OH	141-143	-22,8	Дюксан
Boc-L-IleOH	65-66,5	-32,5	ДМФА
Boc-L-LeuOH	94-95	-48	"

Аминокислота	Т.пл., °C	$[\alpha]_D^{25}$, градус	Растворитель
Вос-L-Lys(Z)OH	83-85	-23,6	"
Вос-L-MetOH	99-100	-48	"
Вос-L-PheOH	132	-21	"
Вос-L-Ser(Bzl)OH	Масло	-	-
Вос-L-TrpOH	114-116	+1,4	ДМФА
Вос-L-Tyr(Bzl)OH	145-146	-3,0	ДМФА
Вос-L-ValOH	64-66	-38,4	Диоксан

* П р и м е ч а н и е. В настоящей и всех последующих таблицах констант соединений не даны литературные ссылки на отдельные производные. Константы заимствованы из оригинальных работ, монографий [1, 4], а также обзорных таблиц Флетчера и Джонса [117-118].

М е т о д и к а 42. *п*-Нитробензилловый эфир бензилоксикарбонил-глутаминил-нитроаргинина [90]



К раствору 10,8 г (27 ммоль) *п*-нитрофенилового эфира бензилоксикарбонил-глутаминила в 70 мл ДМФА прибавляют 1,5 г имидзола и 11,6 г (27 ммоль) бромидрата *п*-нитробензиллового эфира нитроаргинина, растворенного в 40 мл ДМФА с 3,8 мл (27 ммоль) триэтиламина. Раствор перемешивают 6 ч при комнатной температуре и оставляют на ночь. Диметилформамид удаляют в вакууме, а остаток растирают с петролейным эфиром до образования аморфного продукта, который затем кристаллизуют из смеси ДМФА - вода (1:10). Выход 11 г (87 %), т.пл. 190-192 °C, $[\alpha]_D^{25} = -10,4^\circ$ (с=1, ДМФА).

Для более полного удаления *п*-нитрофенола продукт реакции следует тщательно растереть с раствором бикарбоната натрия до исчезновения характерной желтой окраски *п*-нитрофенолята, а затем высушить и очистить кристаллизацией.

N-Оксисукцинимидные эфиры

М е т о д и к а 43. *N*-Оксисукцинимидный эфир трет-бутилоксикарбонилаланина [84]

К раствору 1,32 г (7 ммоль) трет-бутилоксикарбонилаланина и 0,805 г (7 ммоль) *N*-оксисукцинимидна в 20 мл сухого тетрагидрофурана добавляют при 0 °C 1,59 г (7 ммоль) ДПЖ. Реакционную массу перемешивают 2 ч при 0 °C и оставляют на ночь в холодильнике. Образовавшийся осадок отфильтровывают, тетрагидрофуран отгоняют на ротор-

ном испарителе, а остаток кристаллизуют из изопропилового спирта. Выход 1,42 г (71 %), т.пл. 143-144 °C.

В табл. 40 представлены физико-химические характеристики *N*-оксисукцинимидных эфиров *N*-защищенных аминокислот. Синтезированные соединения можно хранить в течение нескольких месяцев в холодильнике без разложения.

Т а б л и ц а 40. Структура и свойства *N*-оксисукцинимидных эфиров *N*-защищенных аминокислот [84]

Аминокислота	Растворитель для кристаллизации	Выход, %	Т.пл., °C	$[\alpha]_D^{25}$, градус (с=2, диоксан)
Z-L-Ala	Изопропиловый спирт	65	123-123,5	-37,2
Z-L-Arg	Этилацетат - петролейный эфир	80	85-86	-9,7
Z-Gly	Хлороформ - петролейный эфир	86	113-114	-
Z-L-Ile	Изопропиловый спирт	56	115,5-116	-15,5
Z-L-Leu	"	51	116-117	-33,6
Z-L-Phe	"	76	140-140,5	-17,3
Z-L-Pro	"	78	90	-54
Z-L-Val	"	53	116-117	-25,1
Z-L-Met	"	59	101-102	-15,9
Вос-L-Ala	"	71	143-144	-49
Вос-L-Cys	"	49	117-117,5	-54
S-Bzl	"	"	"	"
Вос-Gly	"	62	168-170	-
Вос-L-Ile	Диизопропиловый эфир	61	92-93	-25,5
Вос-L-Leu	"	48	116	-41,8
Вос-L-Met	Изопропиловый спирт	59	128-129	-20,6
Вос-L-Phe	"	81	152-153	-19,0
Вос-L-Pro	"	74	135-136	-55,3
Вос-L-Trp	"	37	153-154	-22,4
Вос-L-Val	Хлороформ - метилциклопентан	74	128-129	-37,0

М е т о д и к а 44. Этиловый эфир бензилоксикарбонилфенилаланил-тирозина [84]

К раствору 1,98 г (5 ммоль) сукцинимидного эфира бензилоксикарбонилфенилаланина в 20 мл диоксана прибавляют раствор 1,23 г (5 ммоль) хлоридрата этилового эфира тирозина в хлористом метиле, содержащем 0,69 мл (5 ммоль) триэтиламина. Реакционную смесь перемешивают 1 ч при 20 °C, затем растворитель удаляют в вакууме, а остаток растворяют в этилацетате и последовательно промывают 1 н. соляной кислотой, водой, бикарбонатом натрия и снова водой. Органическую фазу сушат сульфатом магния, этилацетат отгоняют в вакууме, а остаток кристаллизуют из смеси спирт - вода. Выход 2,08 г (85 %), т.пл. 156-158 °C, $[\alpha]_D^{25} = 9,1^\circ$ (с=1, этилацетат).

Методика 45. Пентафторфениловые эфиры N-защитенных аминокислот [75]

Раствор 5 ммоль трет-бутилоксикарбониламинокислоты и 5,5 ммоль пентафторфенола в 5 мл сухого этилацетата или смеси диоксан - ДМФА охлаждают до 0 °С и при размешивании вносят 5,5 ммоль ДПК в 5 мл этилацетата. Реакционную смесь перемешивают 1 ч при 0 °С, дициклогексимочевину отфильтровывают, растворитель удаляют в вакууме, а остаток растирают с гексаном и кристаллизуют из подходящего растворителя.

В табл. 11 приведены физико-химические характеристики синтезированных пентафторфениловых эфиров N-защитенных аминокислот.

Таблица 11. Строение и свойства пентафторфениловых эфиров N-защитенных аминокислот [75, 102]

Формула аминокислоты*	Растворитель для кристаллизации	Выход, %	Т.пл., °С	$[\alpha]_D^{25}$, градус (растворитель)**
Z-Ala	Гексан	-	84-85	-22,4 (этилацетат)
Z-Arg	Спирт	-	98-99	-12,6 (этилацетат)
NO ₂ Z-Asp	"	-	95,5-96	-9,9 (этилацетат)
Bzl Z-Asp	Гексан - бензол	-	76,5-77,5	-43,1 (хлороформ)
OBu ^t Z-Cys	Этилацетат - пентан	-	85-86	-25,6 (этилацетат)
Bzl Z-Glu	Гексан - бензол	-	85-87	-16,5 (этилацетат)
OBu ^t Z-Gln	Спирт - вода	-	116-118	+10,9 (этилацетат)
Z-Ile	"	-	Масло	-13,5 (этилацетат)
Z-Leu	"	-	Масло	-17,7 (этилацетат)
Z-Lys	Хлороформ - гексан	-	105-107	+8,58 (этилацетат)
Z-Met	Спирт	-	104-106	-18,7 (этилацетат)
Z-Phe	"	-	98-100	-26,7 (этилацетат)
Z-Pro	"	-	Масло	-55 (этилацетат)
Z-Ser	Спирт	-	142,5-143,5	-16,2 (этилацетат)
Z-Trp	Хлороформ - гексан	-	124-125	-26,1 (этилацетат)
Z-Val	Спирт - вода	-	50-51,5	-12,8 (этилацетат)
Boc-Ala	Этилацетат - гексан	85	82-83	-31,2 (диоксан)
Boc-Asn	Эфир - гексан	66	124-126	-16,7 (этилацетат)
Boc-Ala	"	98	Масло	-10,7 (этилацетат)

Формула аминокислоты*	Растворитель для кристаллизации	Выход, %	Т.пл., °С	$[\alpha]_D^{25}$, градус (растворитель)**
Boc-Cys	Этилацетат - гексан	73	99-101	-42,0 (этилацетат)
Bzl Boc-Gly	Гексан	70	79-80	-
Boc-Gln	Спирт	82	146-148	-25,8 (этилацетат - диоксан - 1:1)
Boc-Glu	Дизопропиловый эфир	72	90-91	-24,1 (этилацетат)
OBu ^t Boc-Ile	Гексан	98	48-49	-16,9 (этилацетат)
Boc-Leu	"	94	48-50	-30,2 (этилацетат)
Boc-Lys	Этилацетат - гексан	80	54-55	-17,1 (диоксан)
Z Boc-Met	Эфир - гексан	89	80-82	-22,5 (этилацетат)
Boc-Pro	Гексан	88	51-52	-53,0 (диоксан)
Boc-Phe	Этилацетат - гексан	97	111-112	-26,9 (диоксан)
Boc-Thr	"	71	105-106	-32,6 (этилацетат)
Boc-Trp	"	88	109-111	-28,1 (диоксан)
Boc-Ser	"	77	90-91	-29,8 (диоксан)
Boc-Val	Гексан	78	62-64	-18,4 (диоксан)

* Все аминокислоты - L-изомеры.
** 1-2 %-ные растворы.

Методика 46. Пентафторфениловый эфир бензилоксикарбонил-аспарагина [75]

Раствор 1,33 г (5 ммоль) бензилоксикарбониласпарагина и 3,04 г (15 ммоль) пентафторфенола в смеси 3,5 мл ДМФА и 10,5 мл диоксана охлаждают до 0 °С и прибавляют 1,13 г (5,5 ммоль) ДПК. Реакционную смесь размешивают 2 ч при 0 °С, затем дициклогексимочевину отфильтровывают и растворитель упаривают на ротационном испарителе. К остатку добавляют 8 мл эфира, и смесь растирают. Образовавшиеся кристаллы отфильтровывают, промывают охлажденным эфиром и сушат. Выход 2,02 г (94 %), т.пл. 149-150 °С.

Методика 47. трет-Бутиловый эфир бензилоксикарбонил-аспаргинил-глицина [75]

Раствор 0,43 г (1 ммоль) пентафторфенилового эфира бензилоксикарбониласпарагина в 10 мл диоксана охлаждают до 10 °С и вносят 0,185 г (1,1 ммоль) хлоргидрата трет-бутилового эфира глицина. К суспензии прибавляют 0,154 мл (1,1 ммоль) триэтиламина и перемешивают 0,5 ч при комнатной температуре. Соли отфильтровывают, растворитель отгоняют в вакууме, а остаток растирают с эфиром. Осадок

отфильтровывают, промывают эфиром, сушат. Выход 0,34 г (90 %), т.пл. 150–151 °С.

Методика 48. Пентафторфениловые эфиры 9-флуоренилметилоксикарбониламинокислот [103]

К раствору 2 ммоль *l*-аминокислоты и 2 ммоль пентафторфенола в сухом диоксане, этилацетате или в смеси одного из них с ДМФА (5–10 мл) добавляют при охлаждении до 0 °С и перемешивании 2 ммоль ДПМК. Реакционную смесь размешивают в течение 1 ч при 0 °С и затем 1 ч при комнатной температуре. Дипиклогексимочевину отфильтровывают, растворитель отгоняют на роторном испарителе при 40 °С, а остаток растирают с гексаном. Затвердевший продукт отфильтровывают и кристаллизуют из подходящего растворителя.

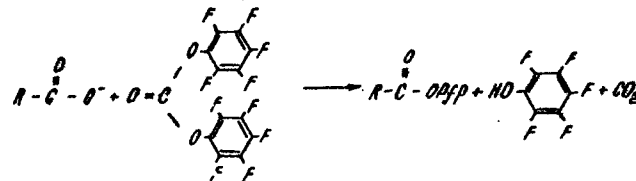
В табл. 12 указаны свойства синтезированных эфиров.

Таблица 12. Строение и свойства пентафторфениловых эфиров 9-флуоренилметилоксикарбониламинокислот [103]

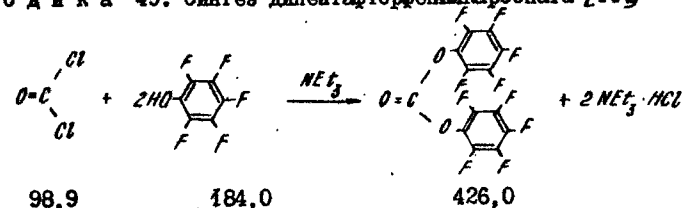
Аминокислота	Растворитель для кристаллизации	Выход, %	Т.пл., °С	$[\alpha]_D^{25}$, градус (с=1, хлороформ)
Ala	Этилацетат – гексан	93	171–173	–22,7
Asp	"	96	164–165	–13,1*
Asp	Этилацетат – диизо-пропиловый эфир	75	128–131	–14,0**
OBzl	Этилацетат – гексан	89	132–134	–31,0
Gly	Этилацетат	99	160–161	–
Gln	"	97	151–153	–19,8*
Glu	Этилацетат – гексан	85	121–123	25,2
OBu ^t	Гексан	78	96–98	–13,4
Ile	Этилацетат – гексан	96	114–116	–25,7
Leu	"	93	106–108	–10,5
Lys	"	93	102–104	–12,6
Met	"	82	127–129	–59,2
Pro	Этилацетат	93	154–157	–25,3
Phe	"	84	125–130	–21,3
Ser	Этилацетат – гексан	85	185–186	–42,1
Trp	"	61	76–78	–12,7
Tyr	"	77	126–128	–39,0
OBu ^t	"	85	122–123	–21,9
Thr	"			
Val	"			

* Оптическую активность измеряли в диоксане.
** Удельное вращение определяли в этилацетате.

Предложен способ синтеза защищенных пентафторфениловых эфиров аминокислот, заключающийся в обработке триэтиламинных солей защищенных аминокислот новым реагентом – дипентафторфенилкарбонатом [104]



Методика 49. Синтез дипентафторфенилкарбоната [104]



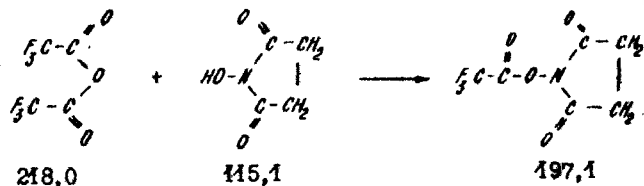
К раствору 0,1 моль (18,4 г) пентафторфенола, 0,1 моль (14 мл) триэтиламина в 150 мл эфира при –20 °С добавляют при перемешивании раствор 0,05 моль (4,9 г) фосгена в 50 мл эфира. Перемешивают 30 мин, повышая температуру до комнатной, затем фильтруют, фильтрат упаривают в вакууме, остаток кристаллизуют из гексана. Выход дипентафторфенилкарбоната количественный. Бесцветный кристаллический продукт не гигроскопичен, т.пл. 49–50 °С.

Методика 50. Пентафторфениловый эфир трет-бутилоксикарбонил-*L*-фенилаланина [104]

К 10 ммоль (2,65 г) трет-бутилоксикарбонилфенилаланина и 10,5 ммоль (1,45 мл) триэтиламина в 20 мл этилацетата добавляют 10,5 ммоль (4,0 г) дипентафторфенилкарбоната и перемешивают при комнатной температуре 30 мин, после чего реакционную смесь промывают 10 %-ным раствором бисульфата калия, сушат над сульфатом магния и упаривают в вакууме. Остаток кристаллизуют из смеси эфир – петролейный эфир. Получают 3,77 г чистого пентафторфенилового эфира трет-бутилоксикарбонил-*L*-фенилаланина (87,3 %), т.пл. 113–114 °С.

1.3.9. Реагенты перэстерификации

Методика 51. *N*-Оксисукцинимидный эфир трифторукусной кислоты [105]

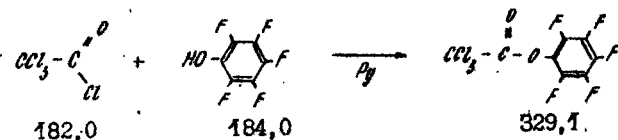


К 10 г (87 ммоль) *N*-оксисукцинимиды прибавляют 22,3 г (103 ммоль) ангидрида трифторуксусной кислоты, смесь размешивают 20 мин при комнатной температуре, а затем избыток ангидрида и трифторуксусную кислоту удаляют в вакууме при температуре ниже 30 °С. Остаток переносят в эксикатор и хранят там над фосфорным ангидридом, поскольку реагент чрезвычайно гигроскопичен. Выход 18,4 г (100 %), т.пл. 69–70 °С.

Методика 52. Этиловый эфир бензилоксикарбонилглицил-фенилаланил-глицина [467]

К охлажденному до 0 °С раствору 0,8 г (25 ммоль) бензилоксикарбонилглицил-фенилаланина в 5 мл пиридина медленно прибавляют 0,7 г (33 ммоль) *N*-оксисукцинимидного эфира трифторуксусной кислоты в 2 мл пиридина. Реакционную смесь размешивают 1 ч при 20 °С, а затем добавляют 0,02 мл воды для разложения избытка реактива Сакакибара. При размешивании в колбу прибавляют 0,47 г (34 ммоль) хлоргидрата этилового эфира глицина в 5 мл хлороформа, содержащего 0,47 мл (34 ммоль) пиридина, и выдерживают 3 ч при комнатной температуре. После удаления растворителя в вакууме всдоустрейного насоса остаток промывают этилацетатом. Выход 0,77 г (78,3 %).

Методика 53. Пентафторфениловый эфир трихлоруксусной кислоты [437]



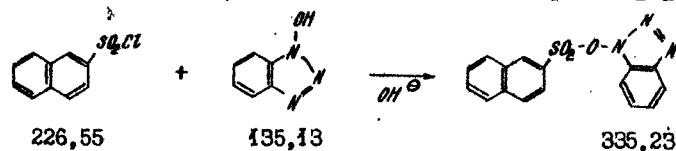
К раствору 39,8 г (0,22 моль) хлорангидрида трихлоруксусной кислоты и 40,1 г (0,22 моль) пентафторфенола в 150 мл бензола прибавляют в течение 30 мин по каплям при перемешивании и охлаждении до 0 °С 17,8 мл (0,22 моль) пиридина, а затем смесь размешивают еще

1 ч при 20 °С. Осадок осянокиолого пиридина отфильтровывают, бензол удаляют в вакууме, а остаток кристаллизуют из небольшого количества гексана и сушат. Выход кристаллического продукта 59,4 г (82 %), т.пл. 43–45 °С.

Методика 54. Общий метод синтеза пептидов с использованием пентафторфенилового эфира трихлоруксусной кислоты [437]

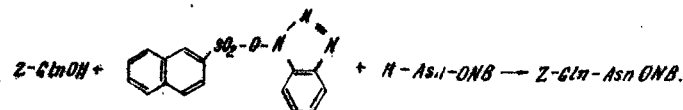
Эквимольные количества ациламинокислоты или *N*-защитенного пептида, триэтиламина и пентафторфенилового эфира трихлоруксусной кислоты перемешивают 1–2 ч при 0–20 °С в таких растворителях, как ДМФА, ацетонитрил, диоксан или метиленхлорид; затем добавляют аминокомпонент (эфир аминокислоты или пептида) и оставляют на несколько часов при комнатной температуре. Пептид выделяют обычным способом. Выход продукта реакции 85–90 %.

Методика 55. 1-β-Нафтилульфонилокобензотриазол [447]



Раствор 22,2 г (165 ммоль) 1-оксibenзотриазола в 60 мл 2,75 н. ацетата натрия (165 ммоль) добавляют по каплям при перемешивании и охлаждении до 0 °С к раствору β-нафтилульфохлорида 33,4 г (147 ммоль) в 600 мл ацетона. Спустя 1,5 ч выпавший осадок отфильтровывают, промывают водой, сушат в вакуум-эксикаторе и кристаллизуют из смеси ацетон – гексан. Выход 40 г (82 %), т.пл. 139–140 °С.

Методика 56. *N*-Нитробензильный эфир бензилоксикарбонилглутаминил-аспарагина [447]



Раствор 0,28 г (1 ммоль) бензилоксикарбонилглутаминила и 0,348 г (1 ммоль) *N*-нитробензильного эфира аспарагина в 4 мл ДМФА охлаждают до 0 °С и при размешивании добавляют 0,224 мл *N*-этилморфолина,

Методика 59. трет-Бутилоксикарбонил-*L*-бензил-глутамил-глицин [108]

Раствор 0,434 г (1 ммоль) *N*-оксисукцинимидного эфира (*L*-бензил)-*N*-карбобензоксиглутаминовой кислоты в 4 мл спирта смешивают с раствором 0,075 г (1 ммоль) глицина и 0,168 г (2 ммоль) бикарбоната натрия в 3 мл воды и оставляют на ночь при комнатной температуре. Затем спирт удаляют в вакууме, оставшийся водный раствор промывают 2 раза этилацетатом и водный слой подкисляют лимонной кислотой. Образовавшийся осадок экстрагируют этилацетатом и последовательно промывают 1 н. раствором лимонной кислоты, водой, сушат сульфатом магния, и растворитель удаляют на роторном испарителе. Остаток кристаллизуют из этилацетата. Выход 0,347 г (88 %), т.пл. 114-115 °C, $[\alpha]_D^{25} = 4,5^{\circ}$ ($c=1$, ДМФА).

Методика 60. трет-Бутилоксикарбонил-фенилаланил-метионин [109]

К раствору 0,6 г (4 ммоль) метионина в 7 мл (0,5 моль) едкого натра добавляют 0,34 г (4 ммоль) кристаллического бикарбоната натрия так, чтобы раствор имел pH 9,0. В реакционную колбу вносят раствор 1,45 г (4 ммоль) *N*-оксисукцинимидного эфира трет-бутилоксикарбонил-фенилаланина в 5 мл ДМФА и затем добавляют еще 15 мл диметилформамида. Реакционную массу перемешивают 18 ч при комнатной температуре, после чего растворитель удаляют в вакууме, а остаток переносят в делительную воронку в смеси 50 мл этилацетата и 50 мл 10 %-ной лимонной кислоты. Органический слой отделяют, промывают 20 мл насыщенного раствора *NaCl*, сушат сульфатом магния и этилацетат отгоняют на роторном испарителе. Затвердевший остаток кристаллизуют из смеси 10 мл этилацетат и 30 мл петroleйного эфира. Выход 1,2 г (78 %), т.пл. 138-140 °C, $[\alpha]_D^{25} = 9,8^{\circ}$ ($c=1$, ДМФА).

Методика 61. *N*-Тозилвалил-аргинин [110]

К раствору 3 ммоль *N*-оксисукцинимидного эфира тозилвалина в 5 мл диоксана прибавляют раствор 3 ммоль аргинина в 2 мл воды, размешивают 3 ч при комнатной температуре и оставляют на ночь. Растворитель упаривают в вакууме, оставшийся маслообразный продукт растворяют в ДМФА, и дипептид осаждают этилацетатом. Бесцветный аморфный

а затем - 0,34 г (1 ммоль) 1- β -нафтилоульфоникомбензтриазола. Реакционную смесь размешивают 10 мин при 0 °C и затем оставляют на 10-12 ч при комнатной температуре. После удаления растворителя в вакууме остаток промывают последовательно 10 %-ным бикарбонатом натрия, водой, 2 н. соляной кислотой, онова водой и спиртом. Продукт кристаллизуют из смеси ДМФА - вода. Выход 0,46 г (90 %), т.пл. 220-222 °C, $[\alpha]_D^{25} = 10,6^{\circ}$ ($c=2$, ДМФА).

1.3.10. Синтез пептидов с незащищенной карбоксильной группой с помощью активированных эфиров

Использование *N*-нитрофениловых эфиров
N-защищенных аминокислот

Методика 57. Бензилоксикарбонил-фенилаланил- ω -тозиларгинин [107]

В 300 мл смеси диоксана - 1 н. *NaOH* (1:1) суспендируют 25,8 г (78,5 ммоль) ω -тозиларгинина и 26,4 г (63 ммоль) *N*-нитрофенилового эфира бензилоксикарбонил-фенилаланина. При размешивании в колбу добавляют из автоматической бюретки смесь диоксана и 1 н. *NaOH* (1:1), поддерживая pH раствора около 8,5. После размешивания реакционной массы в течение 24 ч при комнатной температуре прибавление щелочи прекращают. К полученному раствору добавляют этилацетат, и водную фазу подкисляют 1 н. серной кислотой. Продукт экстрагируют этилацетатом, органическую фазу сушат сульфатом натрия, растворитель отгоняют на роторном испарителе, а остаток растирают с эфиром. Затвердевший пептид отфильтровывают и сушат. Выход 35,3 г (92 %), $[\alpha]_D^{25} = 1,9^{\circ}$ ($c=1$, метанол).

Методика 58. Бензилоксикарбонил-пролил-аргинин-пролин [359]

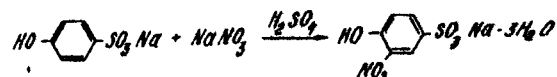
К раствору 0,22 г (8 ммоль) аргинил-пролина в 0,5 мл воды прибавляют 0,39 г (8 ммоль) *N*-нитрофенилового эфира карбобензоксипролина в 0,5 мл диоксана. Реакционную смесь размешивают 2 ч при 45 °C, растворитель удаляют в вакууме, остаток растворяют в 1 мл сухого ДМФА и оставляют на 12 ч при 40 °C. Трипептид осаждают сухим этилацетатом, отфильтровывают и сушат в вакуум-экзикаторе. Выход 3,2 г (84 %), т.пл. 165-167 °C, $[\alpha]_D^{25} = 34^{\circ}$ ($c=0,3$, вода).

продукт отфильтровывают, промывают этилацетатом и кристаллизуют из *n*-бутанола. Выход 0,85 г (66 %), т.пл. 158-160 °С, $[\alpha]_D^{25} = 25,0^0$ ($c=1$, метанол).

Использование 2-нитро-4-сульфофениловых эфиров

М е т о д и к а 62. Натриевая соль

2-нитро-4-сульфофенола [111]



196,2

85

295

В трехгорлый реактор (1 л), оснащенный мешалкой, капельной воронкой и термометром, вносят 132 г (0,67 моль) натриевой соли 4-фенолсульфокислоты и 132 г (1,55 моль) нитрата натрия в 500 мл воды. Смесь нагревают, размешивая до полного растворения натриевой соли фенолсульфокислоты. Температуру раствора снижают до 35-40 °С так, чтобы осадок еще не начал выпадать, и прибавляют из капельной воронки 73 мл концентрированной серной кислоты. Температура реакционной массы начинает медленно подниматься, и после достижения 60 °С колбу необходимо охладить на водяной бане. При добавлении серной кислоты иногда выпадает осадок оранжевого цвета. После добавления кислоты смесь размешивают 1 ч, а затем оставляют еще на 20 ч при комнатной температуре. Продукт, выпавший в осадок, отфильтровывают, хорошо отжимают на фильтре и затем растворяют в горячем насыщенном растворе хлорида натрия. При медленном охлаждении колбы выпадает осадок оранжевого цвета, его отфильтровывают, промывают насыщенным раствором *NaCl* и сушат. Выход 130 г (60 %).

М е т о д и к а 63. Общий метод получения *N*-эфиров

N-защитенных аминокислот [78]

В 20 мл ДМФА растворяют 10 ммоль *N*-защитенной аминокислоты (или карбоновой кислоты) и 10 ммоль натриевой соли 2-нитро-4-сульфофенола, раствор охлаждают до 0 °С и вносят 10 ммоль ДПК. Реакционную смесь перемешивают 1 ч при 0 °С, а затем оставляют на ночь при комнатной температуре. Дидиклогексильмочевину, выпавшую в осадок, отфильтровывают, растворитель удаляют в вакууме, а остаток растворяют в 5 мл спирта. После добавления к полученному раствору эфира смесь выдерживают в течение 2 ч в холодильнике, образовавшийся осадок от-

фильтровывают, промывают эфиром и сушат. После кристаллизации из спирта получают продукт желтого цвета с выходом 50-85 %. Характеристики соединений, полученных по этой методике, приведены в табл.13.

Т а б л и ц а 13. 2-Нитро-4-сульфофениловые эфиры некоторых карбоновых кислот и аминокислот [78]

Исходная карбоновая кислота или аминокислота	Выход <i>N</i> -эфира, %	Хроматографическая подвижность при ТСХ (R_f)*
$\text{CH}_3\text{-COOH}$	70	0,43
$\text{C}_6\text{H}_5\text{-COOH}$	94	0,56
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{-COOH}$	75	0,58
$\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH-COOH}$	66	0,57
<i>Z</i> -Gly-OH	80	0,43
<i>Z</i> -Gln-OH	80	0,49
<i>Z</i> -Phe-OH	68	0,52
<i>Z</i> -Trp-OH	74	0,62
Tos-Ala-OH	58	0,56
Boc-Glu-OH	85	0,66
Boc-Lys-OH	65	0,69
Boc-Trp-OH	72	0,63
Boc-Gly-Gly-OH	90	0,59

* Хроматографическую подвижность определяли на пластинках "Силуфол" (ЧССР) в системе бутанол - уксусная кислота - вода (4:4:1).

М е т о д и к а 64. трет-Бутилоксикарбонил(*γ*-бензил)глутамила-глицина [78]

К раствору 5,6 г (10 ммоль) *N*-эфира *γ*-бензильного эфира трет-бутилоксикарбонилглутаминовой кислоты в 20 мл воды прибавляют 1,5 г (20 ммоль) глицина и 20 ммоль бикарбоната натрия. Реакционную смесь размешивают 4 ч при 0 °С и оставляют на ночь при комнатной температуре. Раствор экстрагируют эфиром, подкисляют лимонной кислотой, и пептид экстрагируют этилацетатом. Органическую фазу промывают водой до pH 7,0 и сушат сульфатом магния, этилацетат отгоняют в вакууме, а остаток растирают с петролейным эфиром. Продукт кри-

тализуют из смеси этилацетат - гексан. Выход 2,7 г (70 %), т.пл. 114 °C, $[\alpha]_D^{25} = 2,2^{\circ}$ (с=1, ДМФА).

Методика 65. Тозилфенилаланил-лейцин [78]

К раствору 1,5 г (3 ммоль) *N*-эфира тозилаланина в 5 мл воды прибавляют при перемешивании 0,53 г (4 ммоль) лейцина в 0,84 г (10 ммоль) бикарбоната натрия. Реакционную смесь размешивают 4 ч при комнатной температуре, а затем подкисляют соляной кислотой до pH 3,0. Образовавшийся осадок отфильтровывают, промывают водой и сушат. Выход 0,6 г (60 %), т.пл. 187-188 °C, $[\alpha]_D^{25} = 29,5^{\circ}$ (с=1, спирт).

Методика 66. Карбобензокситриглицин-глицин [78]

К раствору 3 г (6,1 ммоль) *N*-эфира карбобензокситриглицин-глицина в 30 мл воды прибавляют 1 г (7,6 ммоль) глицилглицина и 1,6 г (20 ммоль) бикарбоната натрия. Реакционную смесь перемешивают 2 ч при 0 °C, а затем выдерживают в течение ночи при комнатной температуре. Раствор, окрашенный в оранжевый цвет, подкисляют соляной кислотой до pH 3,0 и охлаждают. Образовавшийся осадок отфильтровывают и кристаллизуют из воды. Выход 1,2 г (50 %), т.пл. 230-231 °C.

1.3.11. Укороченные методы синтеза пептидов

Методика 67. Метод последовательного синтеза пептидов с использованием избытка смешанных ангидридов (REMA) [112]

Принцип метода заключается в использовании на каждой стадии конденсации избытка ацилирующего агента и наращивания полипептидной цепи без промежуточного выделения и очистки пептида.

К охлажденному до -15 °C раствору *N*-защитенной аминокислоты (1,5 моль эквивалентов) и *N*-метилморфолина (1,5 моль эквивалентов) в тетрагидрофуране или ДМФА добавляют 1,4 моль эквивалентов изобутилхлоркарбоната, размешивают 2 мин и в один прием к реакционной смеси добавляют 1 моль-эквивалент аминокислотного компонента в ДМФА. Размешивание продолжают 3 ч, затем температуру поднимают до 0 °C и прибавляют раствор KHSO_3 до начала слабого выделения углекислого газа. Смесь энергично перемешивают 30 мин, и пептид осаждают 4 объемами насыщенного раствора хлорида натрия. При синтезе больших пептидов

для этого используют воду. Защищенный пептид промывают водой и сушат в вакууме при комнатной температуре.

Высокий выход и чистота синтезируемого пептида позволяют наращивать полипептидную цепь без выделения промежуточного пептида. Полноту реакции ацилирования проверяют ТСХ; после обработки пластинки флуорескаминном интенсиоисность пятна сравнивают визуально с таковой свечения стандартных количеств аминокислотного компонента и, если необходимо, ацилирование проводят повторно. После окончания реакции и разложения избытка смешанного ангидрида непрореагировавшая *N*-защитенная аминокислота удаляется водным раствором KHSO_3 , а защищенный пептид в органическом растворителе сушится, деблокируется и вводится в конденсацию с новым карбоксильным компонентом. Этим методом синтезирована 16-членный фрагмент гастрин 12-27 с общим выходом 31 % [112]. Данным способом получен также секретин свиный (27 остатков аминокислот) [113].

Использование азидов

В 1977 г. Тилак и Хоффманн [114] предложили новый метод азидного синтеза - обработку аминокислотного компонента двойным избытком азидзащитенной аминокислоты с последующим разложением избытка азидра раствором KHSO_3 . Выход пептидов при этом почти количественный, и пептиды получают аналитически чистыми. Авторы работы считают, что описанный метод может быть аналогом ПСА-метода (см. выше) для синтеза больших пептидов без выделения промежуточных продуктов для специальной очистки. Недостатком этого способа по сравнению с ПСА-методом является, по-видимому, сложность получения гидразидов защищенных аминокислот.

Методика 68. Метилловый эфир бензилоксикарбонилтреонил-фенилаланина [114].

Последовательный синтез пептидов с избытком азидра

К охлажденному до 0 °C раствору 2-трн-*NH-NH_2* (2,14 г, 8 ммоль) в смеси 32 мл 1 н. соляной кислоты и 30 мл воды прибавляют при размешивании раствор 0,83 г (12 ммоль) нитрита натрия в 20 мл воды. После перемешивания в течение 50 мин образовавшийся азид экстрагируют 100 мл хлористого метилена; органическую фазу 6 раз промывают холодной водой, сушат сульфатом магния и охлаждают до -15 °C. При размешивании в колбу добавляют раствор метилового эфира фенилаланина, полученного из 0,87 г (4 ммоль) соответствующего хлоргидрата и

0,49 г (4 ммоль) *N*-этилморфолина в 25 мл ДМФА. Реакционную смесь размешивают 3,5 ч при -15 °С, затем хлористый метилен отгоняют в вакууме. Для полного удаления CH_2Cl_2 раствор перемешивают под вакуумом 24 ч при 0 °С. Для разложения избытка азидов к раствору прибавляют 25 мл насыщенного раствора KHSO_3 при 0 °С и перемешивают реакционную массу 45 мин, затем прибавляют 50 мл насыщенного раствора хлорида натрия и взбалтывают в вакууме еще 1 ч при 0 °С. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают водой и сушат. Выход 1,61 г (97 %), т.пл. 99-101 °С, $[\alpha]_D^{25} = +5,2^\circ$ ($c=1$, ДМФА).

Методика 69. Ускоренный синтез пептидов с избытком пентафторфениловых эфиров [81]

Для полного ацилирования аминокомпонента применяют двойной избыток пентафторфенилового эфира *N*-защитной аминокислоты, время образования пептидной связи 10-30 мин, полноту реакции контролируют ТСХ. Удаление избытка активированного эфира осуществляют добавлением *N,N*-диметилазленидиамин в течение 5-10 мин с промывкой органической фазы последовательно лимонной кислотой, водой и 50 %-ным раствором KHSO_3 . После высушивания органический растворитель удаляют в вакууме, остаток обрабатывают раствором HCl в диоксане в течение 10 мин. Хлоридат аминокомпонента осаждают эфиром, промывают и сушат. Пептиды, содержащие 9-10 аминокислот, можно синтезировать в течение одного дня; выход 43-76 %. Пример синтеза биологически активного пептида приведен в Приложении.

Методика 70. Синтез пептидов методом "удержания в растворе"

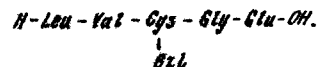
Принцип метода заключается в том, что реакцию проводят в гетерогенной среде, в тонкой эмульсии двух несмешивающихся растворителей - воды и дихлорэтана. В воде находятся Вос-аминокислота, 1-оксобензотриазол и водорастворимый карбодимид; здесь в качестве аминокомпонента следует применять бензиловые эфиры, которые распределяются между органической фазой и водой. После окончания реакции все не прореагировавшие продукты остаются в воде, а защищенный пептид переходит в органическую фазу. После отщепления Вос-группы весь цикл превращений повторяют. Этим способом синтезированы ангиотензин II (8 остатков аминокислот) и пептид дельта-сна (9 остатков аминокислот) с выходом 78 и 53 %.

В качестве примера рассмотрим синтез бензилсвого эфира пролил-фенилаланина [115].

К раствору 0,222 г (0,3 ммоль) тозилата бензилового эфира фенилаланина, 0,07 мл триэтиламина, 0,215 г (1 ммоль) Вос-пролина и 0,135 г (1 ммоль) оксисбензотриазола в 25 мл дихлорэтана прибавляют при комнатной температуре раствор 0,192 г (1 ммоль) 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодимид в 1 мл воды и смесь размешивают 2 ч при этой температуре. Реакционную смесь затем последовательно промывают при 10 °С раствором 0,1 М HCl (3x5 мл), водой (5 мл), раствором 0,5 М бикарбоната натрия (5 мл) и снова водой (4x5 мл). Для отщепления Вос-группы к раствору пептида в дихлорэтано прибавляют 8 мл (7,2 моль) раствора HCl в диоксане при температуре -10 °С и смесь выдерживают 30 мин при 0 °С. Затем к органическому раствору добавляют 18 мл (2 моль) бикарбоната натрия, размешивают, водную фазу отделяют и раствор дипептида в дихлорэтано последовательно промывают водой (2x4 мл), 0,5 М бикарбонатом натрия (4 мл) и снова водой (2x4 мл). Чистоту полученного продукта контролируют ТСХ и аминокислотным анализом.

Методика 71. Использование HCl для синтеза пептидов без выделения [116]

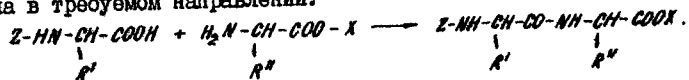
Таким путем синтезирован небольшой фрагмент инсулина:



Синтез пептида осуществляли по стандартной методике 31.

К исходной глутаминовой кислоте (25 ммоль) на каждой стадии последовательно прибавляли *N*-карбодимид-глицина (25,3 ммоль), 3-бензилпиктоин (26,4 ммоль), валина (26,4 ммоль) и лейцина (27,6 ммоль). После присоединения лейцина раствор фильтруют через целит, подкисляют до pH 7,0, снова фильтруют через целит, подкисляют до pH 3,6 и пептид, выпавший в осадок, отфильтровывают. После кристаллизации из воды при pH 3,6 получают хроматографически гомогенный пептид с общим выходом 30 %.

Аминокислоты содержат две реакционноспособные группировки: карбоксильную группу и аминогруппу. При создании пептидной связи необходимо временно блокировать одну из этих групп с тем, чтобы реакция протекала в требуемом направлении:

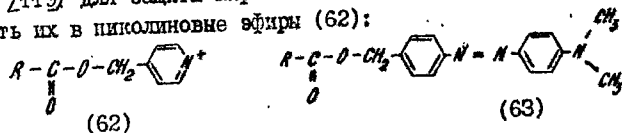


В боковых радикалах некоторых аминокислот (лизина, тирозина и др.) имеются реакционноспособные группы, которые во избежание побочных реакций также необходимо блокировать.

Выбор защитных групп определяется схемой синтеза данного пептида, а также специфическими свойствами остатков аминокислот, например, устойчивостью в условиях удаления защитных группировок. Предложено большое число защитных групп, которые отвечают требованиям, предъявляемым синтезом пептидов. Наиболее важны из этих требований следующие: 1) отсутствие рацемизации; 2) удаление защитных групп без расщепления пептидной связи; 3) возможность селективного удаления одних группировок при сохранении других; 4) устойчивость блокирующих групп при синтезе и хранении пептидов. Существенным моментом является также доступность и простота исходных реагентов, а также способность давать кристаллические производные аминокислот и пептидов. Классификацию защитных групп можно проводить, взяв за основу химическую природу блокирующей группы, способ удаления защитной группы или какой-нибудь другой признак.

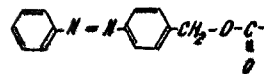
Ниже рассмотрены методы синтеза, условия введения и отщепления наиболее распространенных и перспективных защитных группировок. Обсуждаются также механизмы реакций блокировки реакционных групп и механизмы снятия защиты.

Однако предварительно необходимо остановиться на некоторых специальных функциях защитных групп, которые значительно облегчают выделение, очистку и идентификацию производных аминокислот и пептидов, хотя в литературе эти свойства подробно не освещены. В 1967 г. Янг с соавт. [119] для защиты карбоксильной группы пептидов предложили превращать их в никотиновые эфиры (62):

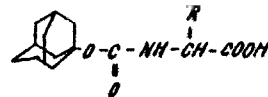


Аракильная группа в этих соединениях помимо защитной функции играет еще одну важную роль: она вносит в молекулу пептида дополнительный положительный заряд. Это позволяет легко очищать указанные соединения от примесей путем "закоривания" пептида при ионообменной хроматографии на катионообменниках.

Для тех же целей Виланд и Реки [120] использовали *N*-диметиламиноазобензильные эфиры аминокислот (63). Присутствие хромофора в защитной группе соединений (63) облегчает визуальную идентификацию пептидов. В качестве окрашенной защитной группы Швицер с соавт. [121] использовал *N*-(фенилазо)-бензилоксикарбонильную группу, что так же, как и в предыдущем случае, упрощает контроль процесса очистки:



(64)



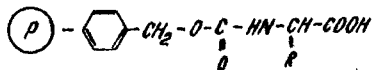
(65)

Примером еще одной группы с дополнительной функцией является адамантилоксикарбонильная группа (Adoc (65)), которая по своим свойствам близка к Boc-группе, но более гидрофобна и поэтому улучшает растворимость защищенных пептидов в органических растворителях.

Синтез пептидов на полимерных носителях обычно рассматривают как некий новый принцип синтеза олигопептидов, заключающийся в имитации растущей полипептидной цепи на нерастворимом полимере. При этом все реагенты легко отмываются простым фильтрованием от нерастворимого носителя. С нашей точки зрения, в данном способе синтеза пептидов использован тот же принцип, который указан в приведенных выше примерах: изменение физико-химических свойств пептидной молекулы и придание ей дополнительных ценных свойств. Идея твердофазного метода синтеза, осуществленная независимо двумя исследователями (Меррифилдом [122] и Лэтсингером [123]), заключается в придании олигопептидной цепи способности не растворяться в растворителях, используемых для реакции. Для этого первую аминокислоту "привязывали" ковалентно к нерастворимому полимеру, а после наращивания полипептидной цепи реагенты удаляли промыванием омола на стеклянном фильтре. Меррифилд закреплял растущую полипептидную цепочку сложэфирной связью, получая бензильный эфир аминокислоты с сополимером стирола и дивинилбензола, а пептид наращивали с С-конца:



Латсингер превращал тот же полимер в аналог бензилоксикарбонильной группы; при этом полпептидная цепь наращивалась с *N*-конца:



В обоих случаях полимер-носитель можно рассматривать как специфическую защитную группу, которая выполняет важную дополнительную функцию — снижает растворимость синтезируемого пептида.

В методе "жидкофазного" синтеза пептидов, предложенном М.М. Шемкиным с соавт. [124], исходную аминокислоту присоединяли оложноэфирной связью к несшитому полистиролу. После каждой стадии синтеза, проводимой в диметилформамиде, раствор выливали в воду. При этом пептид-полимер выпадает в осадок, а низкомолекулярные продукты легко отделяются промыванием на фильтре.

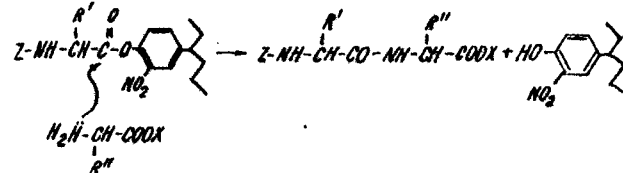
Мутер и Байер [125] в качестве полимерного носителя использовали полиэтиленгликоль ($M_n = 20000$), который присоединяли к смоле сложноэфирной связью. Высокая молекулярная масса носителя, а также его хорошая растворимость в воде и органических растворителях позволяли осуществлять синтез пептидов в хлористом метиле, а после удаления *N*-защитных групп переводить его в водный раствор и отделять низкомолекулярные продукты на мембранном фильтре. В этом методе также использовали изменение физико-химических свойств синтезируемого пептида, в частности, увеличивали молекулярную массу и придавали пептиду растворимость в воде.

Таким образом, защитные, или "временные", группы, кроме своей основной функции (предотвращение нежелательных реакций), могут выполнять некоторые "дополнительные" функции: изменять растворимость пептида, его гидрофобность, молекулярную массу, окраску и т.д.

По аналогии с защитными группами такое "расширение" функциональных возможностей допускают и активирующие группировки. Следовательно, современные защитные группы в отличие от прежних являются по существу "полифункциональными" временными защитными группами. Рассмотрим несколько примеров, демонстрирующих применение в пептидном синтезе дополнительных функций активирующих группировок.

В 1966 г. Фридкин, Пачорник и Качальски [127] предложили использовать полимерные активированные эфиры. По способу этих авторов *N*-защитную аминокислоту активируют нитрофенолом, *N*-оксисукцинимидом и т.п., связанными с полимерным носителем. Аминокислотный компонент,

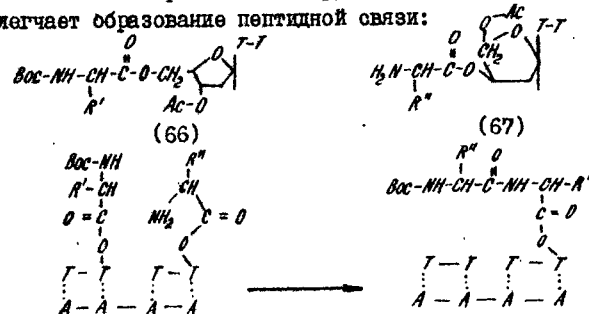
взаимодействуя с активированным карбоксильным компонентом, привязанным к полимерному носителю, ацилирует последний с образованием пептидной связи. Отделение пептида от нерастворимого полимера достигается простым фильтрованием, и это позволяет получить пептид в чистом виде:



В указанном методе "временная" группа выполняет две задачи: она активирует карбоксильный компонент и позволяет удалить один из продуктов реакции — нитрофенол — из раствора.

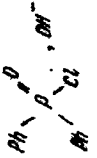
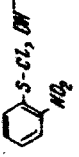
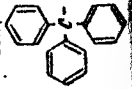
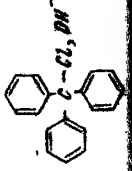
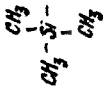
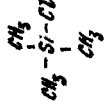
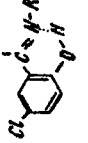
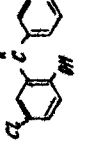
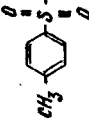
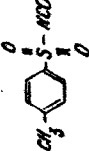
Предложенные нами активированные 2-нитро-4-сульфопенилсые эфиры *N*-защитенных аминокислот, о которых шла речь в гл. 1, также можно рассматривать как пример соединений с "полифункциональной временной группой": эти эфиры активируют карбоксильный компонент и делают его растворимым в воде.

Приведем пример конструирования "временной группы", которая способна выполнять три функции: защиту карбоксильной группы, ее активацию и обложение в пространстве "адресной группы" с другой реакционноспособной группировкой. Данный метод синтеза пептидов, моделирующий биосинтез белка на рибосоме, предложен недавно Уолдером с соавт. [128]. Защищенная аминокислота присоединяется сложноэфирной связью к 5'-гидроксилу тимидил(3'-5')тимидина с образованием продукта (66). Другая аминокислота таким же способом присоединяется к 3'-гидроксилу тимидилтимидина, что дает продукт (67). Если в раствор этих производных добавить тетрауклеотид аденина, то тимидинсые ди-нуклеотиды комплементарно свяжутся с пуриновыми основаниями и произойдет обложение карбоксильной группы со свободной аминогруппой, что облегчает образование пептидной связи:



Название	Обозначение	Формула	Реагент для введения	Способ удаления	Примечание	Литературный источник
Защитные группы уретанового типа						
Ароматические Бензильоксикарбонильная (карбобензокс)	Z, Cbz			1. HBr / AcOH. 2. HCl. 3. HF	Самая распространенная защитная группа. Устойчива в условиях удаления Boc, Aoc, Tr. Производные кристаллизуются лучше. Потомает при 265 мм, что можно использовать для контроля	[129]
p-Нитробензильоксикарбонильная	Z (M ₂)			То же		[130]
o-Нитробензильоксикарбонильная	NBoc			УФ-облучением при 320 нм	Одна из немногих групп, удаляемых фотолитоном	[131]
α, α-Диметил-3,5-диметоксибензильоксикарбонильная	MDI			1. То же. 2. 1-5 % TFA / CH ₂ Cl ₂	То же	[132]
p-Метоксибензильоксикарбонильная	Z (OMe)			1. TFA. 2. HCl	Применяется редко	[133]
Изоникотинилкарбонильная	I-Noc			1. Zn / AcOH. 2. HCl	Очень перспективная группа, устойчива к действию HBr, HCl, TFA, HF	[134]
2-п-Дифенилизопропилоксикарбонильная	Boc			1. 80% AcOH. 2. HBr, HCl 3. TFA, HF	Перспективная группа, селективно удаляется в присутствии Dms, Acс и др.	[135]
Ацетоксикарбонильная	AcOC			Вонный HCl	В TFA более стабильна, чем соответствующая Z-группа	[136]
5-Бензоксазолилметилноксикарбонильная	Bic			1. HCl / Et ₃ N в DMSO (H ₂ SO ₄ , 40 °C)	Предложена недавно	[137]
9-Флуоренилметилноксикарбонильная	Fmoc			Пиперидин, морфолин и другие основания	Весьма перспективная группа, удаляемая основными	[138]
Алифатические трет-Бутилоксикарбонильная	Boc			1. HCl в диоксане, THF, MeOH. 2. TFA. 3. HBr / AcOH.	Наряду с Z-группой является самой распространенной защитной группой. Устойчива к ката-	[139]

Название	Обозначение	Формула	Реагент для введения	Способ удаления	Примечание	Литературный источник
4. Сульфокислоты.						
5. Безводный HCl.						
6. Трифтороацетат бора						
трот-Аллоксикарбонильная	Аос	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O}-\text{C}-\text{CH}_3)_2$	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O}-\text{C}-\text{CH}_3)_2, \text{OH}^-$	Те же реагенты	Используется реже, чем ВОО-группа	[140]
Адамантилоксикарбонильная	Адоc			" "	Адоc-производные, лучше растворяются, чем соответствующие ВОО- и АОО-пептиды. Применяется реже, чем ВОО-группа	[141]
Аллоксикарбонильная	Аос	$\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})$	$\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O}), \text{OH}^-$	" "	Представляет лишь теоретический интерес. Практически не используется	[142]
β, β, β -Трихлорэтоксикарбонильная	Тос	$\text{Cl}-\text{C}(\text{Cl})_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})$	$\text{Cl}-\text{C}(\text{Cl})_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O}), \text{OH}^-$	лп / АсОН	Представляет интерес как группа, стабилизирующая вод-	[143]
7. Замкнутые группы ацильного типа						
2-Фосфонилэтоксикарбонильная	Аос	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})$	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O}), \text{OH}^-$	" "	Новая переносимая защитная группа. Применяется для синтеза пептидов в водном растворе	[144]
n-Метилфенилсульфонильная (тозилонийная)	Тос	$\text{CH}_3-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2$	$\text{CH}_3-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2, \text{Cl}, \text{OH}^-$	Na / NH ₃	Сыграла большую роль в пептидной химии. В настоящее время применяется в основном для защиты боковых групп аминокислот	[145]
Фталильная	Фнт			Гидразингидрат в спирте	В настоящее время не применяется	[146]
Формильная	НФО (Фнт)	$\text{H}-\text{C}(=\text{O})$	$\text{HCOOH} + (\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	1. HCl / спирт. 2. 15% H ₂ O ₂ . 3. Гидразингидрат	Применяется редко из-за склонности производных к рацемизации	[147]
Трифтороацетильная	Тфа (CF ₃ -со)	$\text{CF}_3-\text{C}(=\text{O})$	$(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O} / \text{H}_2\text{N}$	1. NaOH. 2. NaOH в абсолютном спирте	Первая защитная группа, удаляемая основаниями. Используется редко	[148]

Название	Обозначение	Формула	Реагент для введения	Способ удаления	Примечание	Литературный источник
Дифенилпропандицидная	<i>Dpp</i>			1. 80 % <i>HCl</i> 2. 0,4 М <i>NaCl</i> в 90 %-ном трифтороэтанололе. 3. 2 экв. п-толуолсульфонической кислоты	Предложена назван. в отличие от других групп не наблюдается побочного алкилирования триптофана	[149]
о-Нитрофенилсульфонильная	<i>Nps</i>			1. Кислоты реагентами. 2. Тщательное соединения	Широко используется защитная группа, которая легко и селективно удаляется в мягких условиях	[150] [152]
Трифенилметилная (триметильная)	<i>Trt</i>			1. 50 % <i>AsOH</i> . 2. Ледяная <i>AsOH</i> при кипячении.	Служит большой роль в развитии синтетических методов химии пептидов.	[151] [152]
Триметилсилильная	<i>Tms</i>			3. <i>NaCl</i> / метанол. H_2O , опиты	В настоящее время применяется редко Высокой эффективности применения лишь в особых случаях	[153]
5-Хлор-2-оксобензофеноноксиминовая (3,5-Дитрет-бутил-4-оксо-1-фенил-2,5-циклогексадиенильная)	<i>PCld</i>			80 % <i>AsOH</i> (80 °C, 20 мин, 25 °C, 40 ч) 1. <i>H/Hd</i> . 2. 50 %-ная THU в CH_2Cl_2 .	Широкого распространения не нашла Уникальная защитная группа, которая вводится алектрохимическим путем; удаляется в мягких условиях	[154] [155]
Тозиаминонарибонильная	<i>Tac</i>			1. Кипячение со спиртами (1-3 ч). 2. Нагревание со смесью CH_3CN/H_2O (95:5) (80 °C, 4 ч).	Очень интересная группа, удаляемая нейтральными агентами. Может найти широкое применение	[156]

На приведенных выше нескольких наиболее характерных примерах мы пытались продемонстрировать использование дополнительных возможностей полифункциональных "временных" защитных групп, которые все чаще применяются в современном синтезе пептидов. Эти возможности еще далеко не исчерпаны.

В табл. 14 указаны свойства используемых в настоящее время защитных групп для блокирования NH_2 -групп аминокислот и пептидов.

2.1. ОСНОВНЫЕ СПОСОБЫ УДАЛЕНИЯ ЗАЩИТНЫХ ГРУПП И МЕХАНИЗМЫ СООТВЕТСТВУЮЩИХ ПРОЦЕССОВ

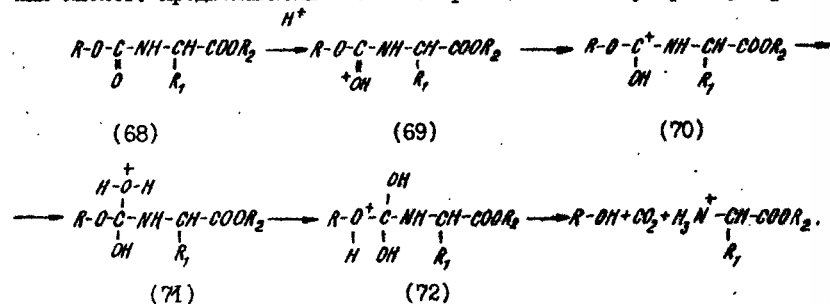
В табл. 15 представлена классификация защитных групп по способам их отщепления: кислотами и основаниями (в мягких или жестких условиях), восстанавливающими агентами, нейтральными реагентами и фотолитическими методами. Рассмотрим кратко некоторые механизмы реакций, происходящих при удалении указанных групп.

2.1.1. Защитные группы, удаляемые кислотами

В настоящее время главными методами отщепления защитных групп является обработка кислотами или восстанавливающими агентами. Большинство N -защитных групп уретанового, алкильного и ариленового типов легко удаляются действием таких кислот, как HBr , HCl , HF , трифторуксусная, уксусная кислоты и т.д.

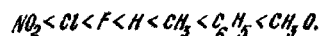
Защитные группы уретанового типа

Карбобензоксигруппа и ее производные отщепляются действием сильных кислот. Предполагаемый механизм реакции бимолекулярный [158]:



В результате протонирования карбонильной группы образуется неустойчивое промежуточное соединение (72), которое быстро распадается

на соответствующий спирт, углекислый газ и свободный аминокомпонент. Реакции способствует повышенная электронная плотность в ароматическом ядре. Как показали исследования Блага и Рудингера [158], скорость отщепления замещенных КБЗ-групп возрастает в следующем ряду:



Действительно, КБЗ-группу обычно удаляют раствором 36 %-ной HBr в ледяной уксусной кислоте, тогда как p -метоксибензильоксикарбонильная группа отщепляется трифторуксусной кислотой.

Для защиты N -конца аминокислот и пептидов наибольшее распространение получила карбобензоксигруппа (Z , cbz), предложенная Бергманом и Зервасом в 1932 г. [129]; она сыграла исключительную роль в развитии синтеза пептидов. Этому способствовали легкость введения этой защитной группы посредством КБЗ-хлорида, способность КБЗ-аминокислот и пептидов кристаллизоваться, простота ее удаления. p -Нитро- и p -метоксикарбобензоксигруппы нашли значительно меньшее распространение.

Защитные группы уретанового типа, содержащие алифатический радикал, например Вос-группа и др., удаляются кислотами в более мягких условиях

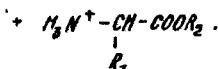
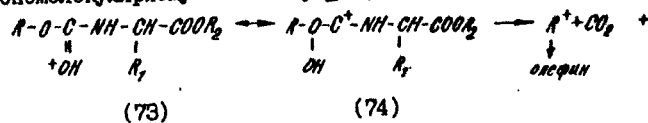
Таблица 15. Классификация защитных групп по способам их удаления

Основные способы удаления			Вспомогательные способы удаления	
Кислотами	Основаниями		Восстанавливающими	Нейтральными реагентами
	сильными	слабыми		
Z , $Z(NO_2)$	Trt	CF_3CO_2	Pht	$R-SH$
$Z(OMe)$	$Broc$	$ABOC, Peoc$	$Z(NO_2)(Teoc)$	$R-SH$
Boc	$Pchd$		$Z(OMe)$	$R-SH$
$Adoc$	$Adoc$	Bic	$INoc$	$R-SH$
HCO_2			Tos	$R-SH$
DPP	DPP		Tac	$R-SH$
DPP, DPA, DZ				$R-SH$

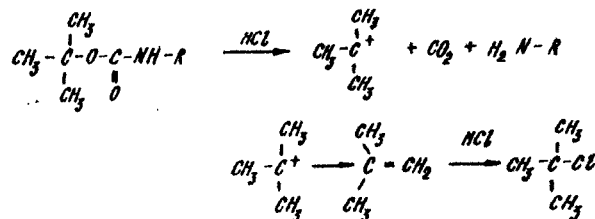
Примечание. Подчеркнутые защитные группы, для которых данный способ удаления является основным.

ях: 1 н. HCl трифторуксусной, муравьиной или сульфокислотами при комнатной температуре.

Вос-группа и родственные ей группировки реагируют с кислотами по мономолекулярному механизму [157]:

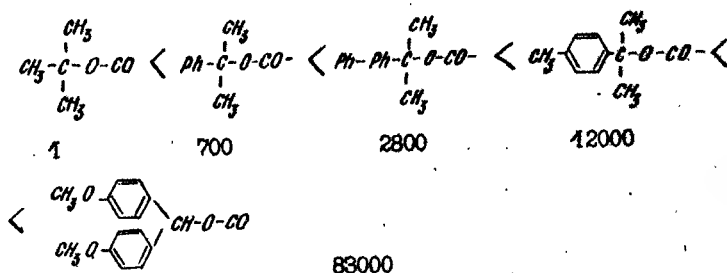


Образующийся катион R^+ может вызывать побочные реакции. Так, при удалении Вос-группы при действии HCl образующийся трет-бутилхлорид способен алкилировать остатки триптофана или метионина [159]



При отщеплении адамантилоксикарбонильной защитной группы образуется весьма стабильный карбокатион, который не дает олефина.

По данным Зибера и Изелина [160], по относительной скорости отщепления некоторых алифатических групп уретанового типа их можно расположить в следующий ряд:



Дифенилизопропилскоикарбонильная группа (Вроо) отщепляется почти в 3000 раз быстрее, чем Вос-группа; α, α -диметил-3,5-диметоксibenзилскоикарбонильная защитная группа занимает промежуточное положение по скорости отщепления: DDZ -защита отщепляется в 1400 раз быстрее,

чем Вос-группа. Из приведенных данных следует, что окорость отщепления защитных групп уретанового типа определяется стабильностью образующегося карбокатиона R^+ . Введение заместителей, способствующих делокализации или уменьшению положительного заряда, приводит к росту скорости удаления защитной группы.

Среди N -защитных групп указанного типа наибольшее распространение получила Вос-группа, которую в 1957 г. предложили Мак-Кэй и Альбертсон [133] и независимо от них - Андерсон и Мак-Грегори [139]. Для введения Вос-группы трет-бутилоксикарбонилхлорид использовать нельзя из-за его неустойчивости. Поэтому было предложено несколько других реагентов, среди которых наибольшую популярность приобрели Вос-азид [161] и ди-трет-бутилпирикарбонат [162]. Вос-группу можно селективно удалять в присутствии карбобензоксигруппы.

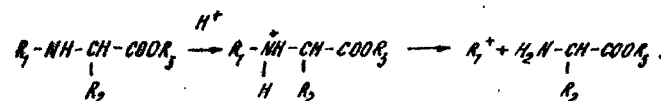
Аналог Вос-группы трет-амилоксикарбонильная защитная группа получила меньшее распространение [140].

В 1968 г. Зибер и Изелин [135] предложили для блокирования N -конца аминокислот и пептидов очень лабильную 2-(p -дифенил)изопропилоксикарбонильную группу, которая нашла достаточно широкое применение в химии пептидов. Врос-группа в 3000 раз лабильнее Вос-группы. Для отщепления Врос-защиты используют смесь муравьиной и уксусной кислот в течение 1,5 ч. Повышенная лабильность Врос-группы позволяет удалять ее также в присутствии тритильной группы.

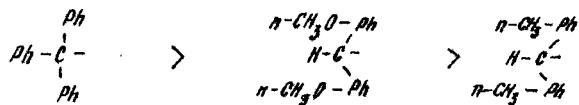
Бирр о соавт. [132] ввел в химию пептидов чрезвычайно лабильную α, α -диметил-3,5-диметоксibenзилскоикарбонильную группу (DDZ) которую можно отщепить в присутствии Вос-группы и трет-бутиловых эфиров действием 1-5 %-ной ТФУ в хлористом метиле в течение 8-30 мин. Эта группа используется весьма широко.

Защитные группы алкильного типа

Отщепление группировок алкильного типа при действии кислот протекает, по-видимому, по механизму, включающему протонирование атома азота аминогруппы и удаление алкильного остатка в виде карбониевого иона:



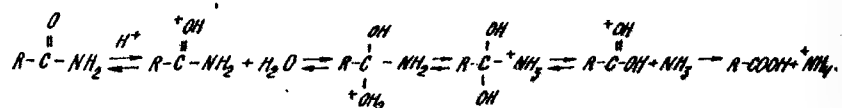
Скорость деблокирования аминогруппы определяется стабильностью карбокатиона R^+ . Из приведенных ниже алкильных групп тритильная оказалась наиболее лабильной [160]:



На раннем этапе развития пептидного синтеза тритильная группа находила применение и была достаточно распространенной защитной группой. Однако в настоящее время она почти не используется, поскольку при синтезе тритильных производных аминокислот и пептидов имеют место стерические препятствия, что снижает выход пептидов.

Защитные группы ацильного типа

Гидролитическое расщепление *N*-ацильных производных аминокислот и пептидов идет, по-видимому, по механизму, аналогичному катализируемому кислотами гидролизу амидов [163]:



В пептидном синтезе нашли применение формильная и нитрофенилсульфенильная группы. При использовании формильной группы для защиты *N*-конца аминокислот наблюдается заметная рацемизация, поэтому ее применяют главным образом для блокирования функциональных групп боковых радикалов аминокислот.

o-Нитрофенилсульфенильная группа (*Nps*) введена в практику пептидного синтеза Герделером и Хольстом [150] в 1959 г. и впоследствии нашла широкое применение как *N*-защитная группа, которая удаляется кислотами. Ее можно отщеплять селективно в присутствии *Boc*-группы и трет-бутиловых эфиров. *Nps*-Группа деблокируется также тиольными соединениями.

При удалении *Nps*-защиты в присутствии *HCl* образуется *o*-нитрофенилсульфенилхлорид. Это следует учитывать при синтезе пептидов, содержащих триптофан, поскольку последний может алкилироваться *Nps*-*Cl*.

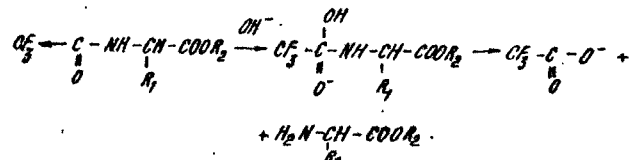
Nps-аминокислоты довольно доступны, весьма легко получают обработкой аминокислот *o*-нитрофенилсульфенилхлоридом в щелочной среде. Защитную *Nps*-группу нельзя использовать в том случае, если предполагается применение каталитического гидрогениза для деблокирования пептидов, так как отравляется катализатор.

Из других ацильных групп недавно была предложена дифенилфосфин-амидная группа (*Dpp*), которая легко отщепляется трифторуксусной кислотой, 0,4 М *HCl* или *p*-толуолсульфокислотой в метаноле [149]. В отличие от *Nps*-группы продукты, получаемые при расщеплении *Dpp*-аминокислот или пептидов при действии *HCl*, не алкалируют остатки триптофана. В связи с этим можно думать, что *Dpp*-защита найдет применение в синтезе триптофансодержащих пептидов.

2.1.2. Защитные группы, удаляемые основаниями

Защитные группы ацильного типа

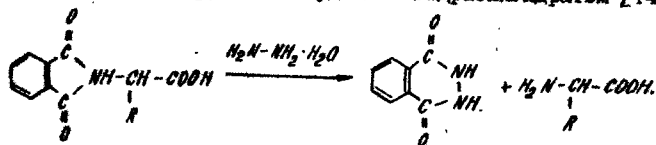
Первой защитной группой, которая легко снималась в щелочной среде, была трифторацетильная группа, предложенная в 1952 г. Вейгандом и соавт. [148]. Сильный индукционный эффект *CF*₃-группы значительно снижает электронную плотность атома углерода карбонильной группы, что облегчает атаку ионом гидроксила. Реакция, очевидно, идет по механизму гидролиза амидов при катализе основаниями:



Предложено также удалять *TFA*-группу боргидридом натрия в абсолютном спирте [164].

TFA-аминокислоты легко синтезируются при действии трифторуксусного ангидрида или тиостилового эфира трифторуксусной кислоты на свободные аминокислоты.

В свое время для защиты α -аминогруппы пептидов применяли фталильную группу, которую можно удалять гидразингидратом [146]:

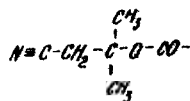


В настоящее время фталильная группа при синтезе пептидов почти не используется.

Защитные группы уретанового типа

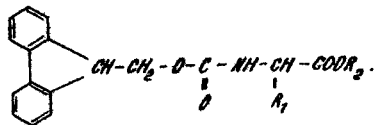
В 1973 г. Вэйн предложил новую интересную защитную группу -

циано-трет-бутилоксикарбонильную группу, представляющую собой модификацию Вос-группы [165]:



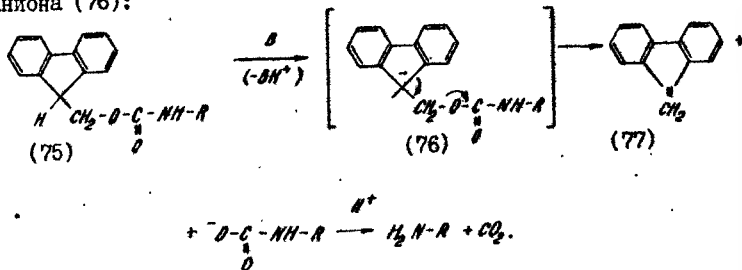
Удаление этой группы осуществляется водными растворами K_2CO_3 или триэтиламина. Практического применения она, однако, не получила.

По-видимому, наиболее перспективной среди защитных групп, лабильных в щелочной среде, является 9-флуоренилоксикарбонильная группа (Fmoc), которую в 1972 г. предложили Карпино и Хан [138]:



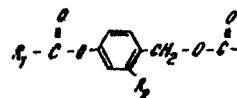
Fmoc-группа стабильна в кислой среде, но отщепляется основаниями: пиперидином, морфолином и др. Она используется как в классическом, так и в твердофазном методах синтеза пептидов.

Механизм отщепления Fmoc-группы заключается в следующем. В результате мощного электроакцепторного эффекта бензольных колец атом водорода, находящийся в девятом положении, приобретает кислый характер и легко отрывается основаниями. Это ведет к возникновению карбаниона (76):



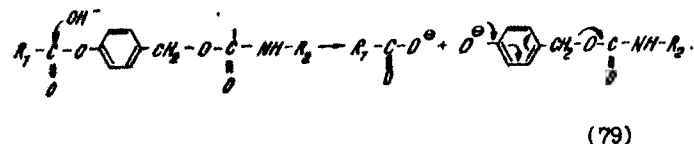
Карбанион (76) быстро распадается, образуя свободный аминокомпонент и дибензофульвен (77), который дает аддукт с основаниями.

Легкость деблокирования определяется в данном случае стабильностью карбаниона типа (76), который образуется путем β -элиминирования. По сходному механизму происходит отщепление в щелочной среде защитной группы, предложенной де Корром с соавт. [136]. Она представляет собой модифицированную карбобензоксигруппу. де Корр и др. исследовали п-ацилзамещенные производные типа (78)

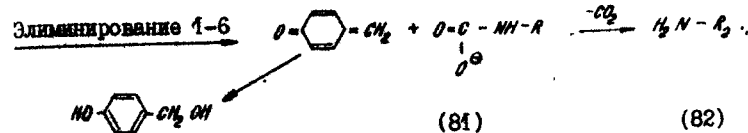


(78)

где $R_1 = CH_3$, C_2H_5 , $(CH_3)_2CH$, $(CH_3)_2CH-NH$, $(CH_3)_2N$ и др., $R_2 = H$, Cl. Щелочной гидролиз производных аминокислот с указанными группами протекает следующим образом:



(79)



(81)

(82)

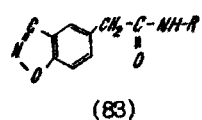
(80)

В результате нуклеофильной атаки основания ацетоксигруппа (78) образует п-оксизамещенное производное Z-защитной аминокислоты (79); последнее претерпевает элиминирование 1-6 и превращается в карбаминное производное аминокислоты (81) и хинон (80). После декарбоксилирования продукта (81) образуется аминокислота (82). Для предотвращения реакции между хиноном (80) и аминокислотой (82) в реакционную смесь добавляют сульфит натрия, который восстанавливает хинон, превращая его в п-оксидбензильный спирт.

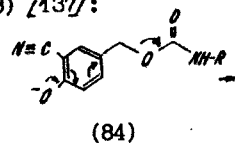
При отщеплении групп типа (78) в качестве основания используют водный раствор аммиака с добавкой перекиси водорода. При pH 9,5 анион HOO^- является более сильным нуклеофилом, чем гидроксильный ион.

Можно предположить, что рассмотренные группы окажутся весьма перспективными для синтеза пептидов.

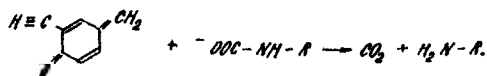
В 1978 г. Кэмп предложил оригинальную N-защитную группу - 5-бензизоазаолилметилоксикарбонильную (Ac) (83) [137]:



(83)



(84)



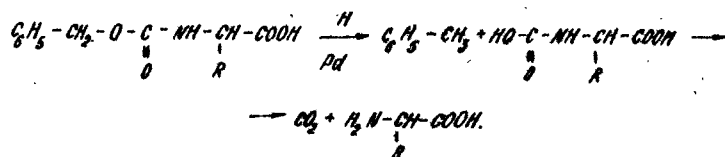
(85)

Устойчивое соединение (83) в апротонных растворителях (ДМФА, ацетонитрил) при действии оснований легко изомеризуется в соединение (84). Например, при действии двух эквивалентов триэтиламина в ДМФА при 25 °С изомеризация протекает за 30 мин. Последующее выдерживание в течение 3 ч при 40 °С в водно-спиртовом растворе сульфата натрия (рН 7,0) дает свободную аминокислоту. В этом случае бисульфит натрия необходим для предотвращения взаимодействия хинона (85) с аминокислотой.

2.1.3. Защитные группы, отщепляемые каталитическим гидрированием

Для деблокирования некоторых защитных групп используют следующие восстановители: цинк в уксусной кислоте, натрий в жидком аммиаке и боргидрид натрия. Однако наибольшее распространение получил метод деблокирования путем каталитического гидрирования над палладием. Этим способом удаляется Z-группа, ее производные, алилоксикарбонильная группа и расщепляются эфиры, используемые для блокирования карбоксильных и оксигрупп аминокислот.

Предполагается, что каталитическое отщепление Z-группы протекает через стадию образования замещенной карбаминовой кислоты с последующим выделением углекислого газа [129]:



В качестве катализатора при гидрировании используются: палладиевая чернь, палладий на угле или на сульфате бария, оксид палладия или оксид палладия на угле. Вместо молекулярного водорода для восстановления можно использовать такие доноры водорода, как циклогексен [166, 167], циклогексадиен [168], муравьиную кислоту [169] и формиат аммония [170]. Эти реагенты, предложенные в последние годы, позволяют вести восстановление защитных групп быстрее и нередко дают более чистые продукты.

Лоосе с соавт. [171] предложил в качестве катализатора для гид-

рогенолиза использовать комплексную соль $\text{H}_2[\text{Co}(\text{CN})_6]$, которая позволяет количественно удалять Z-группу и расщеплять бензильные эфиры. Этот катализатор дешевле палладиевого и может найти широкое применение.

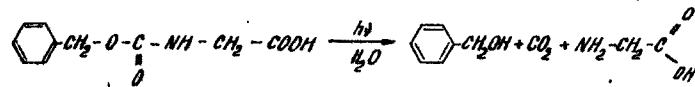
2.1.4. Защитные группы, удаляемые УФ-облучением

Наиболее мягким методом удаления защитных групп является, по-видимому, фотолитическое расщепление.

В 60-е годы экспериментально установлено, что введение некоторых электронодонорных и электроноакцепторных заместителей может приводить к гетеролитическому процессу ароматических соединений при их УФ-облучении. Следует отметить, что в возбужденном состоянии ориентирующее влияние заместителей меняется по сравнению с их влиянием в основном состоянии: электроноакцепторные группировки, например NO_2 , оттягивают электроны от орто- и пара-положений, а электронодонорные заместители "накачивают" электроны в мета-положение. Следовательно, в фотореакциях мета-положение бензольного кольца в нитробензоле является местом атаки нуклеофильными агентами, а в анизоле — местом электрофильной атаки:

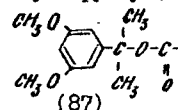
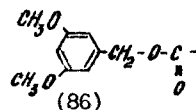


В 1962 г. Барлтроп и Шоффилд [172] показали, что при УФ-облучении Кбз-аминокислот последние расщепляются с образованием свободной аминокислоты, бензильного спирта и CO_2 . При деблокировании Кбз-глицина облучением светом с λ_{max} 254 нм выход глицина достигает 75 %:

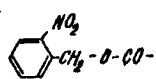


Поскольку введение NO_2 - или CH_3O -групп изменяет чувствительность соединения к фотолитическому расщеплению, испытано несколько замещенных Кбз-групп в качестве фотоллабильных группировок.

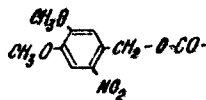
Так, Чемберлен [173] предложил для этой цели 3,5-диметоксибензилоксикарбонильную группу (86), а Бирр с соавт. [132] использовал α, α' -диметил-3,5-диметоксибензилоксикарбонильную группу (87)



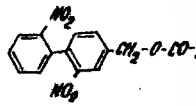
В 1969 г. Пачорник, Амит и Вудворд [174] изучали возможность применения в химии пептидов таких фотолabileных групп, как о-нитробензильоксикарбонильная (88), 6-нитровератрилоксикарбонильная (89) и 2,2'-динитродифенилоксикарбонильная (90), используя УФ-свет с длиной волны 320 нм:



(88)



(89)



(90)

В качестве промежуточных продуктов при фотолитическом расщеплении образуются альдегиды. Для того чтобы они не реагировали с аминогруппой, в реакционную смесь добавляют либо минеральную кислоту, либо вещества, способные взаимодействовать с альдегидной группой (например, гидразин), который превращает их в гидразоны.

2.2. МЕТОДЫ СИНТЕЗА РЕАГЕНТОВ, ИСПОЛЪЗУЕМЫХ ДЛЯ БЛОКИРОВАНИЯ АМИНОГРУПП ПЕПТИДОВ И АМИНОКИСЛОТ

2.2.1. Карбобензоксигруппа

Карбобензоксиклорид

Гринштейн и Внип [1] рекомендуют синтезировать карбобензоксиклорид по методу Фартинга, т.е. насыщением бензильового спирта фосгеном при $-10 \dots -30^\circ\text{C}$. Практика показывает, что чистый карбобензоксиклорид можно получить лишь после перегонки. Однако в некоторых руководствах отмечается, что перегонка в вакууме может привести к взрыву, поэтому карбобензоксиклорид лучше не перегонять. Применение неочищенного препарата вызывает затруднения при кристаллизации карбобензоксикаминокислот, которые получают в этом случае в виде масла.

Достаточно чистый карбобензоксиклорид без перегонки удается получить при добавлении бензильового спирта к избытку жидкого фосгена при -30°C . Для синтеза бензильоксикарбониламинокислот можно использовать также раствор Кбз-хлорида в толуоле. Получение этого раствора описано в "Синтезах органических препаратов" [175].

М е т о д и к а 72. Синтез карбобензоксиклорида
с использованием жидкого фосгена



84,0

109,0

156,5

В н и м а н и е! Вся работа с фосгеном необходимо проводить в хорошо вентилируемом вытяжном шкафу; у каждого сотрудника, работающего с фосгеном, должен быть противогаз марки "В".

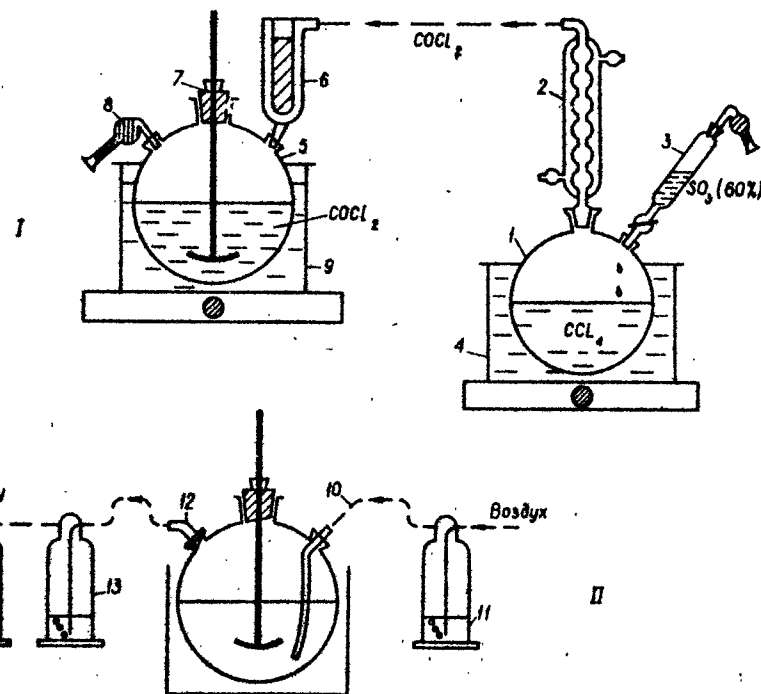


Рис. 1. Аппаратура для синтеза Кбз-хлорида

Аппаратура для синтеза Кбз-хлорида (рис. 1, I) состоит из двух блоков: установки для получения фосгена и реактора для синтеза карбобензоксиклорида. Трехгорлую колбу вместимостью 2 л 1, снабженную обратным холодильником 2 и капельной воронкой 3 с хлоркальциевой трубкой, заполненной CaCl_2 , помещают в масляную баню 4. Синтез Кбз-хлорида ведут в трехгорлой колбе вместимостью 2 л 5, которую снабжают низкотемпературным холодильником 6, мешалкой 7 и хлоркальциевой трубкой 8. Колбу погружают в баню, охлаждаемую

до -70°C ацетоном с сухим льдом; этой же смесью наполняют и холодильник 6. Перед началом работы на стенке колбы 5 делают отметку вместимости 400 мл.

В колбу 1 помещают 200 г инфузорной земли или тефлоновых стружек, 1 л сухого четыреххлористого углерода и нагревают на масляной бане до 80°C . При этой температуре из воронки 3 добавляют в течение 2-3 ч 200 мл 60 %-ного олеума с такой скоростью, чтобы CCl_4 кипел; выделяющийся фосген конденсируется в колбе 5. После того как оооберется необходимое количество жидкого фосгена до метки 400 мл (5,5 моль), подачу олеума прекращают, а нагрев масляной бани выключают. Затем низкотемпературный холодильник 6 заменяют капельной воронкой на 100-200 мл, включают мешалку 2 на медленные обороты (для предотвращения вскипания фосгена). Во избежание перегрева и вскипания фосгена нельзя прекращать перемешивание! Из воронки добавляют по каплям в течение 1-2 ч 545 мл сухого бензильного спирта. Температуру охлаждающей бани поддерживают при $-40 \dots -70^{\circ}\text{C}$. После того как весь бензильный спирт будет добавлен, баню 9 убирают, а реакционную массу энергично размешивают в течение 1-2 ч. По газоотводной трубке 8 удаляют избыток фосгена и выделяющийся хлористый водород. Эти газы отводят в колбу с раствором щелочи, помещая газоотводную трубку над поверхностью щелочного раствора.

Для полного удаления фосгена и хлористого водорода через систему продувают воздух (рис. 1, II). Вместо капельной воронки вставляют трубку 10, которую соединяют со склянкой Дрекселя, содержащую концентрированную серную кислоту; последняя необходима для поглощения влаги воздуха. Хлоркальциевую трубку 8 заменяют трубкой, которую присоединяют к ловушке 13, заполненной 10 %-ным раствором едкого натра, и затем - к ловушке 14, содержащей спиртовой раствор аммиака. Воздух просасывают через реактор 5 в течение 24 ч с помощью водоструйного насоса.

Карбобензоксиклорид, полученный этим способом, достаточно чист и пригоден к употреблению; выход составляет 880 г (720 мл). Для дегазации прибора содержимое колбы (1) разбавляют серной кислотой и осторожно выливают под тягой в эмалированное ведро с толченым льдом; содержимое нейтрализуют щелочью и удаляют в раковину под вытяжным шкафом. Карбобензоксиклорид - бесцветная или слегка желтоватая жидкость с резким запахом, раздражающим слизистую оболочку. Его следует хранить в холодильнике над сульфатом магния.

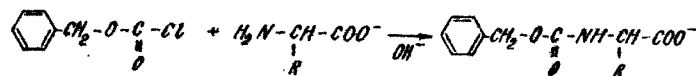
Для получения небольших количеств фосгена можно использовать реакцию взаимодействия четыреххлористого углерода, формальдегида и хлористого алюминия [176].

Методика 73. Синтез фосгена [176]



Трехгорную колбу (1 л) снабжают термометром, капельной воронкой и обратным холодильником, верхняя часть которого соединена с ловушкой, охлаждаемой сухим льдом и ацетоном. В реактор загружают 15 г (0,5 моль) параформа, 100 г (0,65 моль) сухого четыреххлористого углерода и 16,7 г (0,125 моль) безводного хлорида алюминия. Реакционную смесь нагревают на водяной бане до $35-40^{\circ}\text{C}$ и выдерживают затем при этой температуре 2-2,5 ч, собирая жидкий фосген. Когда приток фосгена уменьшится, содержимое колбы нагревают и кипятят в течение 1 ч. Для прекращения реакции баню удаляют, ловушку с фосгеном отсоединяют, а охлажденную реакционную массу нейтрализуют добавлением из капельной воронки водного раствора аммиака. Выход фосгена 42 г (85 %).

Синтез бензилоксикарбониламиноокислот



Большинство Кбз-аминокислот получают действием карбобензоксиклорида на водно-щелочной раствор аминокислоты при низкой температуре. Ниже приведено несколько прописей.

Методика 74. Карбобензокси-L-триптофан [177]

К раствору 10,2 г (0,05 моль) L-триптофана в 50 мл 1 н. едкого натра прибавляют по каплям, размешивая и охлаждая до 0°C , 8,4 г (0,05 моль) карбобензоксиклорида. Поддерживают pH 9,0 добавлением (из другой капельной воронки) 50 мл 1 н. NaOH . Через 1 ч после прекращения подачи карбобензоксиклорида содержимое колбы переносят в делительную воронку и избыток карбобензоксиклорида экстрагируют 20 мл эфира. Водный раствор подкисляют 1 н. соляной кислотой до pH 3,0; при этом карбобензокситриптофан выпадает в виде масла. В холодильнике продукт кристаллизуется; его отделяют фильтрованием, промывают водой до нейтральной реакции и сушат на воздухе. После кристаллизации из смеси этилацетат - петролейный эфир выход составляет 16,6 г (85 %), т.пл. 126°C .

Кбз-производные аспарагина, глутамина, γ -бензильного эфира глутаминовой кислоты, а также β -бензильного эфира аспарагиновой кислоты синтезируют иначе, так как для этих аминокислот при высоких значениях pH может произойти омыление сложноэфирных групп и гидро-

лиз амидов. Для синтеза Кбз-производных тирозина, гистидина, лизина и аргинина, защищенных лишь по α -аминогруппе, также необходимы специальные условия эксперимента. Ниже приведены соответствующие методики.

Методика 75. Карбобензойско- α -глутамин [179]

К раствору 14,6 г (0,1 моль) α -глутамина в смеси 25 мл 4 н. едкого натра и 100 мл 1 н. раствора бикарбоната натрия (pH 9,6) одновременно прибавляют при охлаждении и перемешивании в течение 1 ч 24,5 г (0,15 моль) карбобензоксиклорида в 40 мл диоксана и 30 мл 4 н. NaOH. Смесь размешивают еще 45 мин при 20 °C, затем 1 н. соляной кислотой доводят pH до 7,0 и избыток Кбз-хлорида экстрагируют эфиром. Раствор подкисляют до pH 1,0, выпавшие кристаллы отфильтровывают, промывают водой до нейтральной реакции и сушат в эксикаторе. После кристаллизации из воды выход Кбз-глутамина составляет 25 г (80 %), т.пл. 133-137 °C.

Методика 76. β -Бензиловый эфир карбобензойскоглутаминовой кислоты [179]

23,7 г (0,1 моль) β -бензилового эфира α -глутаминовой кислоты и 20 г (0,24 моль) бикарбоната натрия растворяют при 65 °C в 1 л воды. К раствору при постоянном размешивании добавляют по каплям 20 мл карбобензоксиклорида и продолжают перемешивание до тех пор, пока температура реакционной массы не опустится до 50 °C; на это требуется примерно 50 мин. Затем колбу охлаждают, раствор обрабатывают эфиром (30 мл x 2), фильтруют и подкисляют до pH 2,0. Выпавшее масло экстрагируют эфиром; эфирные вытяжки промывают водой, оодержащей 7 мл 1,4 н. раствора бикарбоната калия, сушат сульфатом магния и эфир удаляют на ротаторном испарителе. Остаток растворяют в четыреххлористом углероде, упаривают до объема 140 мл и оставляют на ночь в холодильнике. Выпавшие бесцветные иголки отфильтровывают и сушат. Выход 19,8 г (54 %), т.пл. 76-78 °C.

Если продукт не удастся закристаллизовать, его можно перевести в кристаллическую дидицлогексиламмонийную соль. Продукт реакции растворяют в эфире и добавляют небольшой избыток дидицлогексиламмина. Через некоторое время выпадает кристаллическая ДЦА соль β -бензилового эфира карбобензойскоглутаминовой кислоты:

Методика 77. Карбобензойско- α -аргинин [180]

К охлажденному до 0 °C раствору 63 г (0,3 моль) хлоргидрата- α -

аргинина в 300 мл 1 н. NaOH прибавляют в течение 1 ч при перемешивании 55 мл карбобензоксиклорида и 165 мл 2 н. раствора едкого натра, поддерживая pH 9-10. После добавления всего карбобензоксиклорида размешивание продолжают еще 2 ч, а затем подкисляют до pH 7-7,5. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают 150 мл холодной воды и кристаллизуют из 400 мл кипящей воды. После отделения продукта фильтрованием и высушивания кристаллы размешивают в течение 1 ч со смесью 400 мл ацетона и 200 мл эфира, отфильтровывают и сушат в вакууме при 50 °C. Выход бесцветных кристаллов 82,7 г (89,5 %), т.пл. 184 °C, $[\alpha]_D^{25} = 9,3^\circ$ (c=1, 1 н. соляная кислота).

В монографии [1] описан удобный метод синтеза карбобензойскоаминокислот при комнатной температуре в присутствии избытка бикарбоната натрия.

В качестве примера приводим весьма простую методику синтеза карбобензойско- α -аргинина, которая дает возможность получить очень чистый, прекрасно кристаллизующийся продукт.

Методика 78. Карбобензойско- α -аргинин [181]

К суспензии 63 г бикарбоната натрия в 250 мл воды в колбе емкостью 1 л прибавляют 42,2 г (20 ммоль) хлоргидрата α -аргинина и перемешивают при комнатной температуре до полного растворения. Затем вносят 37,4 г (31 ммоль) карбобензоксиклорида пятью равными порциями в течение 30 мин и перемешивают еще 1 ч при комнатной температуре. Смесь подщелачивают до pH 8,5 концентрированным раствором аммиака и выдерживают 2 ч при 4 °C. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают холодной водой и кристаллизуют из воды, в которую добавляют несколько капель аммиака. Выход бесцветного кристаллического продукта 58,6 г (95 %), т.пл. 175 °C.

Физико-химические характеристики карбобензойскоаминокислот представлены в табл. 16.

Таблица 16. Свойства карбобензойскоаминокислот

Аминокислота	Т.пл., °C	$[\alpha]_D^{25}$, градус
α -Аланин	87	-13,9 (c=2, метанол)
α -Аргинин	175	-9,2 (c=2, 1 н. HCl)
ω -Нитро- α -аргинин	134-136	-3,5 (c=1, метанол)
ω -Дикарбобензойско- α -аргинин	138-139	+16,8 (c=1, CHCl ₃)
α -Аспарагин	165	+7,6 (c=1, уксусная кислота)
α -Аспарагиновая кислота	116	+9,6 (c=7, уксусная кислота)

Аминокислота	Т.пл., °C	$[\alpha]_D^{25}$, градус
β -Бензиловый эфир L -аспарагиновой кислоты	107-108	+11,9 ($c=10$, уксусная кислота)
ДПГА-соль β -бензилового эфира L -аспарагиновой кислоты	117-118	+14,8 ($c=1$, этиловый спирт)
L -Валин	59-60	+1,5 ($c=5$, этанол)
L -Глутамин	139-141	-5,7 ($c=5$, этанол)
L -Глутаминовая кислота	120-121	-7,9 ($c=10$, уксусная кислота)
δ -Бензиловый эфир L -глутаминовой кислоты	75-76	-22,7 ($c=1,4$, 1 н. KNO_3)
ДПГА-соль δ -бензилового эфира L -глутаминовой кислоты	144-146	+7,9 ($c=2,9$, метанол)
Глицин	120	-
L -Гистидин	166-167	-25,0 ($c=6$, 6 н. HCl)
N^m -Бензил- L -гистидин	214-215	+6,4 ($c=5$, уксусная кислота)
N^m -Карбобензоксид- L -гистидин	90,5-92	+29,1 ($c=1$, этилацетат)
L -Изолейцин	44-46	+6,5 ($c=6$, этанол)
L -Лейцин	Масло	-16,4 ($c=1,8$, этанол)
ДПГА-соль L -лейцина	151,5-152	-7,9 ($c=3$, метанол)
N_c -Карбобензоксид- L -лизин	278-280; 235	+17,3 ($c=2$, 2 н. HCl)
N, N -Дикарбобензоксид- L -лизин	88-90; 80	-5,0 ($c=2$, метанол)
L -Метионин	68-69	-31,6 ($c=1$, метанол)
L -Оксипролин	106-107	-72,0 ($c=1$, хлороформ)
L -Пролин	76-77	-61,7 ($c=5$, уксусная кислота)
L -Серин	121; 114-116	+5,6 ($c=6$, уксусная кислота)
O -Бензил- L -серин		
O -трет-Бутил- L -серин	85-87	+21,2 ($c=2,8$, этанол)
L -Тирозин	101	+11,1 ($c=3$, уксусная кислота)
O -Бензил- L -тирозин	112-113	-5,0 ($c=10$, уксусная кислота)
O, N -Дикарбобензоксид- L -тирозин	117	-5,0 ($c=10$, уксусная кислота)
L -Треонин	103-104	-5,8 ($c=2$, уксусная кислота)
ДПГА-соль O -трет-бутил- L -треонина	146-147; 126-126,5	+9,9 ($c=1$, этилацетат)
L -Триптофан	126	-
L -Фенилаланин	88-89	+5,1 ($c=2$, этанол)
S -Бензил- L -цистеин	135-136	-36,6 ($c=5$, этанол)

Удаление бензилоксикарбонильной группы

Удаление раствором бромистого водорода в ледяной уксусной кислоте

Методика 79. Получение насыщенного раствора бромистого водорода в ледяной уксусной кислоте

Для получения газообразного бромистого водорода используют реакцию бромирования тетралина или нафталина.

В двугорлый реактор, снабженный обратным холодильником и капельной воронкой, помещают избыток тетралина, а в капельную воронку - рассчитанное количество брома. Для поглощения паров брома, увлекаемых током HBr , газоотводную трубку соединяют с двумя склянками Дрекселя, одна из которых заполняется тетралином, а другая - суспензией красного фосфора в толусоле. Для предотвращения попадания влаги из воздуха колбу, содержащую уксусную кислоту, соединяют с хлоркальциевой трубкой, наполненной плавленым $CaCl_2$.

Ток бромистого водорода регулируется скоростью подачи брома.

Сначала насыщение уксусной кислоты бромистым водородом ведут при комнатной температуре, поскольку при охлаждении она может затвердеть; затем колбу с уксусной кислотой можно охлаждать, поместив ее на баню со льдом. Если вместо тетралина используется нафталин, в реакционную колбу целесообразно внести небольшое количество бензола и при добавлении брома нагревать ее на водяной бане. Степень насыщения уксусной кислоты бромистым водородом контролируют по привесу. В табл. 17 представлены соответствующие данные из расчета на 36 %-ный раствор HBr в уксусной кислоте.

Свежеприготовленный раствор бромистого водорода в уксусной кислоте почти бесцветен; при длительном хранении (что нежелательно) он приобретает желтоватую окраску.

Методика 80. Бромгидрат этилового эфира глицил- L -аланина

В 15 мл безводной уксусной кислоты суспендируют 10 г (0,033 моль) этилового эфира карбобензоксиглицил- L -аланина и прибавляют равный объем (15 мл) 36 %-ного раствора бромистого водорода в ледяной уксусной кислоте. Колбу закрывают пробкой, снабженной U -образным счетчиком пузырьков, который заполняют серной кислотой. Это предот-

Таблица 17. Количество HBr , необходимое для насыщения уксусной кислоты до 36 %

Исходная масса уксусной кислоты, взятой для насыщения, г	Масса HBr , г	Общая масса HBr в уксусной кислоте, г
50	28	78
100	56	156
150	84	234
250	140	390
300	168	468
500	280	780

вращает проникновение влаги из воздуха и позволяет следить за скоростью выделения CO_2 . Отщепление карбобензоксигруппы проходит за 30–40 мин. Затем содержимое колбы выливает тонкой струйкой в 200 мл сухого эфира; при этом выпадает белый творожистый осадок бромоводородной соли дипептида. Надосадочную жидкость декантируют, осадок промывают сухим эфиром, быстро отфильтровывают и хорошо промывают эфиром. Бромгидраты пептидов часто расплываются на воздухе, поэтому операции промывания и декантировки следует вести так, чтобы над осадком оставался слой эфира; сразу после окончательной промывки продукт помещают в вакуум-экстрактор с сухим адским натром. Выход продукта 7 г (85 %).

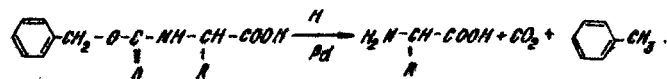
Полученные бромгидраты пептидов без дополнительной очистки можно вводить в пептидный синтез. Часто такие продукты адсорбируют некоторое количество бромистого водорода, который не удаляется даже в вакуум-экстракторе. В связи с этим рекомендуется переводить их в свободные основания следующим способом: к суспензии или раствору бромгидрата пептида сначала прибавляют рассчитанное количество третичного амина (триэтиламина, *N*-метилморфолина и т.д.), измеряют pH раствора по индикаторной бумажке и (если необходимо) добавляют по каплям избыток соответствующего основания до значения pH раствора 8–9.

Наряду с бензилоксикарбонильной группой бромистый водород отщепляет и другие кислотолабильные защитные группы, расщепляет трет-бутиловые эфиры и частично бензиловые эфиры пептидов. Следует также иметь в виду, что HBr/AcOH разрушает остаток триптофана и разрывает пептидную связь между глицином и пролином, которая лабильна в кислой среде.

При деблокировании гидрофобных пептидов их бромистоводородные соли могут сначала оставаться в растворе при выливании реакционной массы в эфир. Такое явление, в частности, наблюдалось при деблокировании *Z*-группы у *p*-нитробензилового эфира карбобензоксифенилаланил-лейцина. Кристаллический осадок бромгидрата указанного пептида образовался только при стоянии реакционной смеси в холодильнике в течение 30 мин.

Отщепление *Z*-группы каталитическим гидрогенолизом

Карбобензоксигруппа легко отщепляется при действии водорода в присутствии таких катализаторов, как палладиевая чернь, оксид палладия и палладий на угле, с образованием углекислого газа и толуола [182]:



Во восстановление вводится при комнатной температуре и атмосферном давлении в спиртовых, водно-спиртовых растворах или смесях спирта, воды и кислоты. При необходимости удаления *Z*-группы в присутствии других кислотолабильных защитных групп гидрирование следует вести в отсутствие кислоты. В процессе гидрирования одновременно с карбобензоксигруппой расщепляются бензиловые и *p*-нитробензиловые эфиры, а также деблокируется гуанидиновая группа ω -нитроаргинина. Метил-, этиловые и трет-бутиловые эфиры пептидов при этом не расщепляются; не происходит деблокирования также трет-бутилоксикарбонильной, тейловой и некоторых других защитных групп. Это позволяет осуществлять селективное деблокирование пептидов. Необходимо отметить, что при гидрировании остаток триптофана не изменяется.

Ввиду того что палладиевый катализатор легко отравляется серосодержащими соединениями, гидрирование непригодно для удаления *Z*-группы у цистеин- и метионинсодержащих пептидов, а также у пептидов, блокированных *o*-нитросульфонильной защитной группой. По этой же причине в приборе для гидрирования следует избегать применения резиновых трубок и пробок. Каталитическое гидрирование ведут на установке, изображенной на рис. 2.

Палладиевая чернь пирофорна, поэтому катализатор хранят под слоем воды. Более удобна в работе окись палладия: ее можно сохранить в сухом виде. При гидрировании окись палладия превращается в активный губчатый палладий. Палладиевую чернь используют чаще, чем окись палладия, по-видимому, из-за того, что ее легче получить.

Методика 81. Приготовление палладиевой черни [182]

В колбу Кьельдаля вместимостью 250 мл помещают 25 мл "царской водки" (смесь 1 части концентрированной азотной кислоты и 3 частей

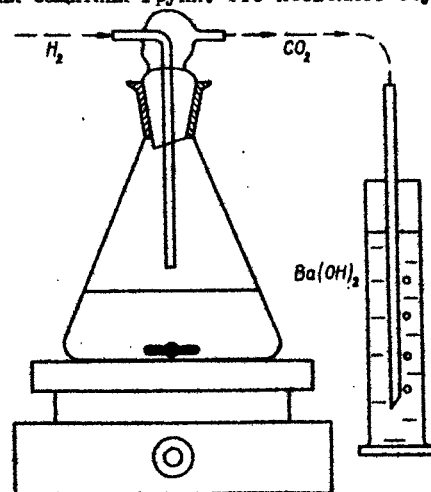


Рис. 2. Прибор для каталитического гидрирования пептидов

концентрированной соляной кислоты) и 6 г мелко нарезанных кусочков палладиевой фольги. Смесь выдерживают 20 мин при комнатной температуре, а затем осторожно нагревают в вытяжном шкафу до полного растворения металла. Полученный раствор упаривают досуха, затем остаток растворяют в 15 мл концентрированной соляной кислоты, и снова раствор упаривают досуха; эту операцию повторяют еще раз, а затем остаток растворяют в 40 мл 5 н. соляной кислоты и фильтруют в колбу, содержащую 600 мл горячей дистиллированной воды. К горячему раствору при взбалтывании добавляют по каплям 1,8 мл муравьиной кислоты, после чего при энергичном встряхивании прибавляют порциями около 100 мл 5 н. едкого кали до щелочной реакции на лакмус. К полученному раствору при размешивании добавляют по каплям муравьиную кислоту так, чтобы среда оставалась слабо щелочной. Обильный осадок палладиевой черни отделяют декантацией и многократно промывают дистиллированной водой.

Катализатор хранят в плотно закрытом сосуде под слоем воды, предохраняя его от контакта с серосодержащими материалами и реагентами (сероводородом, алкилмеркаптанами и т.д.). Для проверки активности катализатора необходимо внести небольшое количество губчатого палладия в пробирку, промыть метанолом, а затем поместить на фильтровальную бумагу. Если катализатор активен, наблюдается возгорание и обугливание фильтра.

Очень хорошим катализатором является оксид палладия на угле.

Методика 82. Приготовление оксида палладия на угле [183]



Для очистки активного угля навеску его (50 г) заливают 150 мл 15 % ной соляной кислоты и кипятят в течение 30 мин. Горячий раствор фильтруют, уголь промывают горячей водой до pH 7,0 и сушат при 110 °C в течение 1 ч. Проба этого угля со смесью разбавленных HCl и HNO₃ не должна давать реакции на железо с гексациано(III)ферратом калия.

Для получения хлористого палладия 2,5 г палладия помещают в фарфоровую чашку на кипящую водяную баню и при размешивании медленно добавляют около 60 мл "царской водки" до полного растворения палладия. Раствор упаривают досуха, а коричневый остаток растворяют в 300 мл дистиллированной воды, слегка подкисляют HCl, фильтруют и разбавляют дистиллированной водой до объема 350 мл.

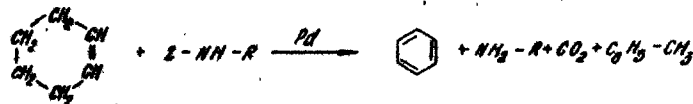
В стакан емкостью 500 мл, снабженный механической мешалкой, термометром, капельной воронкой и помещенный на асбестовую сетку, насыпают 50 г очищенного активного угля, вносят 230 мл дистиллированной воды и содержимое нагревают при слабом размешивании до 80 °C, а из капельной воронки медленно прибавляют раствор хлорида палладия. Не прекращая нагревания и перемешивания, добавляют по каплям 10 %-ный раствор NaOH до щелочной реакции. Раствор перемешивают, выдерживают при 80 °C до тех пор, пока из отфильтрованной пробы смеси, подщелоченной едким кали, при кипячении с несколькими каплями 40 %-ного формалина не перестанет выделяться черный осадок палладия.

Уголь с адсорбированным на нем оксидом палладия фильтруют и промывают теплой водой до исчезновения щелочной реакции по лакмусу. Осадок сушат при 110 °C и после измельчения в ступке хранят в банке с притертой пробкой. Влажный осадок можно промыть абсолютным спиртом и сушить при комнатной температуре.

Методика 83. Общий метод гидрогенолиза пептидов

Навеску карбобензоксипептида (0,15 моль) суспендируют или растворяют в 60 мл смеси метанол - уксусная кислота - вода (6:1:1), прибавляют палладиевый катализатор и гидрируют 3-4 ч при комнатной температуре, контролируя ход реакции деблокирования ТСХ, а также по прекращению выделения CO₂ (проба с гидроксидом бария). После окончания реакции катализатор отфильтровывают, промывают водой и растворитель упаривают в вакууме при 40 °C. Остаток можно использовать для синтеза пептидов без дополнительной очистки.

Методика 84. Восстановительное отщепление 2-группы циклогексеном [166, 167]



Навеску карбобензоксинаминокислоты или Кбз-пептида растворяют в этиловом спирте или в метаноле, прибавляют требуемое количество циклогексена и палладия на угле. Обычно используют равное по массе пептида или полторакратное количество катализатора. Смесь кипятят 15 мин, затем катализатор отфильтровывают, промывают водой, а растворитель упаривают в вакууме. Выход продукта 90-100 %.

Методика 85. Деблокирование гуанидиновой группы нитроаргинина циклогексеном [167]

745 мг *Boc-Phe-Arg(NO₂)-OH* и 14 мл циклогексена растворяют в 28 мл спирта. Для полного растворения пептида прибавляют 3 мл уксусной кислоты. К раствору добавляют 75 мл палладиевой черни, и реакционную смесь кипятят с обратным холодильником в течение 6 ч, контролируя степень отщепления нитрогруппы при помощи ТСХ. После окончания реакции катализатор отфильтровывают, растворитель упаривают в вакууме, а остаток пересаживают из смеси метанол – этилацетат. Выход ацетата пептида 88 %, т.пл. 175–180 °С.

Методика 86. Деблокирование пептидов циклогексоксином [168]

Защищенный пептид (1 ммоль) растворяют в 4 мл абсолютного этилового спирта в колбе, снабженной барботером. Реакционную колбу помещают на водную баню при 25 °С и продувают током сухого азота. Затем прибавляют 10 %-ный палладий на угле (1 эквивалент на каждую удаляемую группу) и 0,94 мл (10 ммоль) 1,4-дициклогексоксиана. Реакцию ведут по крайней мере 2 ч, после чего катализатор отфильтровывают, промывают ДМФА, уксусной кислотой и водой, растворитель упаривают в вакууме, а остаток обрабатывают, как обычно. Выход около 90 %.

Этим способом можно деблокировать *Z*-, *Δ*κ1-, *Δ*κ2- группы у пептидов, содержащих остатки гистидина, аргинина, тирозина, метионина и других аминокислот.

Методика 87. Восстановительное деблокирование *Z*-группы с помощью муравьиной кислоты [169]

Раствор 200 мг карбобензоксипептида в 2–10 мл 4,4 %-ного (по объему) раствора муравьиной кислоты (88 %-ной) в метаноле добавляют к 10 мл 4,4 %-ной муравьиной кислоты в метаноле, содержащей 200 мг палладиевого катализатора. Смесь размешивают 10 мин при комнатной температуре в атмосфере азота, затем катализатор отфильтровывают, промывают 10 мл метанола и 10 мл воды. Растворитель упаривают на роторном испарителе, и остаток кристаллизуют из подходящего растворителя. Выход 90–97 %.

Следует отметить, что этим способом удалось гладко деблокировать этиловый эфир карбобензоксипептида-метионил-глицина, что обычно не удается при традиционном методе отщепления *Z*-группы. Гуанидиновая группа нитроаргинина отщепляется муравьиной кислотой примерно за 5 ч. Для контроля окончания реакции удобно использовать ТСХ.

Методика 88. Деблокирование пептидов формиатом аммония [170]

К раствору защищенного пептида в метаноле или ДМФА добавляют от 0,1 до 0,5 части по массе пептида 10 %-ного палладия на угле и 2–4 эквивалента формиата аммония. Реакционную смесь выдерживают в течение 5–10 мин и затем катализатор отфильтровывают, растворитель удаляют в вакууме, а остаток лиофилизируют или растворяют в этилацетате и затем экстрагируют насыщенным раствором хлористого натрия. В дальнейшем выделение пептида ведут, как обычно.

Время для удаления *Z*-группы в большинстве случаев составляет около 1 мин; нитрогруппа отщепляется примерно за 5–10 мин. Для деблокирования бензильных групп оверина и треснина в смеси метанол – уксусная кислота (1:1) требуется 30 и 90 мин.

Методика 89. Удаление *Z*-группы смесью тиоанизола и трифторуксусной кислоты [184]

Деблокирование пептидов при помощи тиоанизола в трифторуксусной кислоте происходит по "пуш-пулл" механизму и сопровождается также отщеплением *O*-бензильной защитной группы тирозина.

Навеску (0,1 ммоль) *Z*-аминокислоты или пептида растворяют в 27 мл трифторуксусной кислоты, добавляют 5 ммоль тиоанизола и реакционную смесь выдерживают 3 ч при комнатной температуре, а затем растворитель удаляют в вакууме. Остаток обрабатывают обычным способом и выделяют продукт реакции.

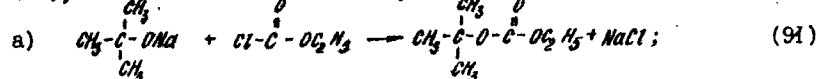
2.2.2. трет-Бутилоксикарбонильная группа

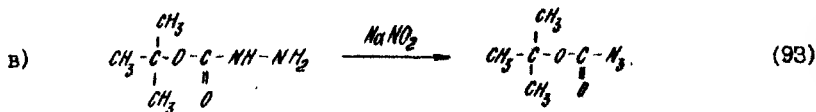
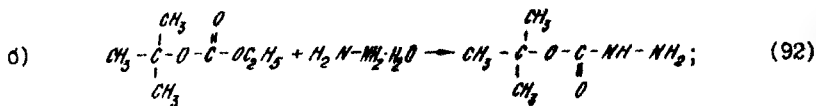
Синтез реагентов для получения Вос-аминокислот

Основным методом введения Вос-группы является обработка аминокислот ди-трет-бутилпирикарбонатом [185–187] или Вос-азидом [188, 189].

Методика 90. Синтез трет-бутилоксикарбонилзида [189]

Вос-азид получают в три стадии: сначала готовят трет-бутилэтилкарбонат (91), который превращают в трет-бутилоксикарбонилгидразид (92), а последний – в соответствующий азид (93):





Методика 91. трет-Бутилэтилкарбонат (91) [189]

Круглодонный трехгорлый реактор (2 л), снабженный мешалкой и эффективным холодильником с хлоркальциевой трубкой, закрепляют над плиткой с закрытой спиралью. В реактор помещают 250 мл абсолютного толуола, 69 г металлического натрия, включают мешалку и нагрев плитки. Когда натрий расплавится, мешалку запускают на полные обороты и размешивание продолжают 20–30 мин. После получения тонкой суспензии натрия нагрев отключают и, продолжая перемешивание, снижают температуру реакционной смеси до комнатной. Мешалку останавливают и толуол сливают, а остаток его как можно полнее отсаивают с помощью пипетки и водоструйного насоса.

Реактор помещают на баню, охлаждаемую сухим льдом и ацетоном, и прибавляют 1430 мл абсолютного третичного бутилового спирта. Скорость реакции регулируют охлаждающей баней или удалением охлаждения. Взаимодействие трет-бутанола с натрием должно идти с такой скоростью, чтобы обратный холодильник не "захлебывался". После завершения реакции колбу подогревают, а затем затвердевшую массу оставляют на 24 ч при комнатной температуре, защищая от попадания влаги и воздуха. Для окончания реакции реактор нагревают на масляной бане при 125 °С в течение 5 ч, после чего массу охлаждают.

Реактор снабжают капельной воронкой, термометром и помещают на баню со льдом; при постоянном размешивании добавляют по каплям в течение 1–1,5 ч 285 мл этилового эфира хлортольной кислоты (температура внутри колонн должна быть не выше 24–28 °С). После того как весь этилхлорформат будет добавлен, смесь оставляют на ночь при комнатной температуре, а затем добавляют 600 мл воды и переносят в делительную воронку на 2 л и экстрагируют эфиром (3х200 мл). Соединение вытяжки сушат сульфатом магния (500 г) в течение 24 ч. Раствор фильтруют в двухлитровую круглодонную колбу, снабженную дефлегматором, и эфир отгоняют. Остаток нагревают на масляной бане, медленно

поднимают температуру до 130 °С; при этом отгоняются примеси с температурой кипения до 83 °С. Остаток перегоняют в вакууме, собирая фракции с т.кип. 62–64 °С (5,1–5,3 кПа). Выход продукта 300–305 г (70 %).

Чистый трет-бутилэтилкарбонат – бесцветная или слегка желтоватая жидкость с т.кип. 62 °С (4,7 кПа).

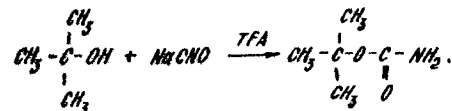
Методика 92. трет-Бутилоксикарбонилгидразид (92) [189]

В круглодонную колбу вместимостью 2 л, онаженную обратным холодильником, через который пропущена мешалка, помещают 300–305 г трет-бутилэтилкарбоната и 520 г (505 мл) гидразингидрата. Колбу устанавливают на плитку с закрытой спиралью и кипятят при непрерывном размешивании в течение 13 ч. После охлаждения до комнатной температуры содержимое переносят в делительную воронку вместимостью 2 л и добавляют насыщенный раствор хлористого натрия (500 мл). Затем смесь экстрагируют эфиром (4х300 мл). Органическую фазу промывают 200 мл насыщенного раствора хлористого натрия и сушат сульфатом магния в течение ночи. Затем раствор фильтруют, эфир удаляют на роторном испарителе. Остаток затвердевает. Выход бесцветного кристаллического продукта составляет 137–145 г (52–56 %), т.пл. 38–40 °С, т.кип. 70–72 °С (0,47 кПа).

Примечание. Если после отгонки растворителя продукт не затвердевает, его необходимо растворить в эфире, высушить сульфатом магния и эфир отогнать.

Вос-гидразид можно получить по способу Ф.М. Мутулиса и соавт. [190] без использования хлортольной кислоты. Предлагаемый способ заключается в нитровании трет-бутилкарбамата с последующей обработкой образующегося трет-бутил-*N*-нитрокарбамата гидразингидратом.

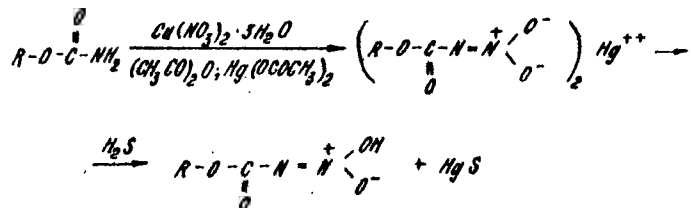
Методика 93. трет-Бутилкарбамат



К омею 7,4 г (0,1 моль) трет-бутилового спирта и 13 г (0,2 моль) циановодородной кислоты в 25–100 мл бензола (увеличение объема растворителя снижает выход продукта) медленно добавляют при размешивании 15,5 мл трифторуксусной кислоты. Идет слабая экзотермическая реакция и из раствора выделяются пузырьки газа. После прекращения подачи трифторуксусной кислоты смесь размешивают в течение 3 ч, затем в колбу добавляют 15 мл воды, органическую фазу отделяют и сушат

сульфатом магния. Растворитель удаляют на ротормном испарителе, после чего остаток затвердевает; выход 92 %. После кристаллизации из воды получают 8 г (70 %) трет-бутилкарбамата с т.пл. 107-108 °С.

М е т о д и к а 94. трет-Бутил-*N*-нитрокарбамат [190]

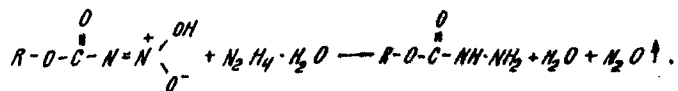


В н и м а н и е! Соединения двухвалентной ртути чрезвычайно ядовиты. Работать с ними можно только в вытяжном шкафу в резиновых перчатках, надев респиратор.

В колбу объемом 2,5 л вносят 800 мл уксусного ангидрида, 117,1 г (1 моль) трет-бутилкарбамата и 171,5 г (0,5 моль) ацетата двухвалентной ртути; реакционную смесь охлаждают до 8 °С и прибавляют 300 г $Cu(NO_3)_2 \cdot 5H_2O$. Массу размешивают 2 ч, поддерживая температуру смеси 8-13 °С путем помещения колбы на баню со льдом. Затем реакционную смесь выливают в 1 л воды с толченым льдом, фильтруют; осадок на фильтре последовательно промывают водой, подкисленной уксусной кислотой, спиртом и эфиром. Выход бесцветного кристаллического продукта 212 г (81 %).

В 300 мл ацетона суспендируют 52,3 г (0,1 моль) ртутной соли трет-бутил-*N*-карбамата, охлаждают до -20 °С и при размешивании вводят ток сероводорода (предварительно высушенного пропусканием через безводный хлористый кальций) до тех пор, пока смесь не станет совершенно черной. Выпавший осадок отфильтровывают на плотном стеклянном фильтре и промывают ацетоном. Фильтрат собирают, и растворитель упаривают на ротормном испарителе при комнатной температуре. Кристаллический остаток высушивают на воздухе. Выход бесцветного трет-бутил-*N*-нитрокарбамата 28,6 г (88 %), т.пл. 59 °С. Продукт хорошо растворим в спирте и эфире, не растворим в петролейном эфире.

М е т о д и к а 95. трет-Бутилоксикарбонилгидразид (92) [190]



К 30 мл гидразингидрата (0,6 моль), охлажденного до -20 °С, прибавляют 32,4 г (0,2 моль) трет-бутил-*N*-нитрокарбамата и перемешивают до полного растворения, а затем оставляют на 6-12 ч при комнатной температуре. Жидкая реакционная смесь постепенно расслаивается и выделяются пузырьки газа. Реакционную смесь экстрагируют хлористым метиленом (3х50 мл). В соединенные вытяжки вносят по 30 г борной кислоты и сульфата магния, размешивают 10 мин и фильтруют через складчатый фильтр. Осадок на фильтре промывают 100 мл хлористого метилена, затем растворитель упаривают на ротормном испарителе при комнатной температуре. Остаток вскоре кристаллизуется. Выход Вос-гидразида 22,8 г (86 %), т.пл. 39-40 °С.

М е т о д и к а 96. трет-Бутилоксикарбонилгидразид (93) [189]

Раствор 100 г Вос-гидразида и 88 мл уксусной кислоты в 125 мл воды охлаждают льдом и при сильном размешивании добавляют в течение 50-60 мин при 10 °С 54,4 г нитрита натрия или его раствор в 80 мл воды. Реакционную смесь перемешивают еще 30 мин и после этого добавляют 125 мл воды. Содержимое колбы переносят в делительную воронку, нижний водный слой отделяют, а верхний, окрашенный в желтый цвет, промывают водой (3х50 мл) и 1 н. раствором бикарбоната натрия (3х40 мл), а затем помещают в колбу, содержащую 10 г сульфата магния. В таком виде Вос-азид хранят в холодильнике.

В н и м а н и е! Вос-азид ядовит. Вдыхание его паров вызывает головную боль. Продукт можно перегонять при 73-76 °С (9,4 кПа). Однако это нежелательно, поскольку возможен взрыв.

Вос-азид следует хранить в холодильнике не более двух дней.

Синтез трет-бутилоксикарбониламинокислот по Шнабелю

В 1967 г. Шнабель предложил получать Вос-аминокислоты из Вос-азидов и аминокислот в водно-диоксановом растворе при строго контролируемых (на pH-отате) условиях pH среды [191]. До недавнего времени это был наиболее распространенный способ синтеза Вос-аминокислот. В настоящее время появились более современные методы введения Вос-группы, но метод Шнабеля до сих пор распространен достаточно широко, так как позволяет получать Вос-аминокислоты высокой чистоты с отличным выходом. В табл. 18 представлены условия синтеза Вос-аминокислот по Шнабелю.

Т а б л и ц а 18. Условия синтеза Вос-аминокислот по Шнабелю [191]

Аминокислота	pH реакционной среды	Время реакции, ч	Выход, %
L-Аланин	10,4	8	95
L-Аргинин	12,0	18	75
ω-Нитро-L-аргинин	9,8	24	93
L-Аспарагиновая кислота	10,2	26	68
L-Аспарагин	9,5	40	72
L-Валин	9,5	8	93
Глицин	10,0	2,5	90
L-Глутамин	10,3	24	82
L-Изолейцин	9,8	6,5	96
L-Лейцин	9,7	9,0	97
ω-Карбобензокси-L-лизин	10,2	9,0	95
L-Метионин	9,7	6,0	95
L-Пролин	8,6	0,5	96
L-Серин	9,3	2,9	85
L-Треснин	9,5	30	88
L-Триптофан	9,8	9,5	84
O-Бензил-L-тирозин	9,8	20	98
L-Тирозин	9,8	18	94
δ-Бензил-L-цистеин	9,6	14	98
L-Фенилаланин	10,4	13,5	91

М е т о д и к а 97. трет-Бутилоксикарбонил-L-изолейцин [191]

L-Изолейцин в количестве 6,56 г (50 ммоль) суспендируют в смеси 10 мл диоксана и 10 мл воды, затем вносят 7,8 г (55 ммоль) Вос-азиды и на автоматитраторе поддерживают pH 9,8 добавлением в течение 6,5 ч 4 н. раствора едкого натра, при этом последнего расходуется примерно 22 мл. После прекращения подачи щелочи смесь экстрагируют 50 мл эфира, водную фазу подкисляют лимонной кислотой и продукт экстрагируют эфиром (2х50 мл) и этилацетатом (2х25 мл). Соединенные вытяжки промывают водой (5х10 мл), сушат и растворитель удаляют на роторном испарителе. Оставшееся масло растроят с петролевым эфиром до затвердевания продукта. Выход бесцветного Вос-L-изолейцина - 11,1 г (96 %), т.пл. 66-68 °C, $[\alpha]_D^{25} = +2,5^\circ$ (с=1, уксусная кислота).

М е т о д и к а 98. Стандартный метод выделения N_α -Вос-аминокислот [191]

После окончания реакции с Вос-азидом органический растворитель (спирт, диоксан) отгоняют на роторном испарителе при 40 °C, остаток разбавляют водой в 1,5 раза, раствор насыщают хлористым натрием и экстрагируют эфиром или петролевым эфиром, а затем водный слой подкисляют избытком лимонной кислоты, небольшим избытком 1 н. серной кислоты или раствором бисульфата натрия до pH 3-3,5 и Вос-аминокис-

лоту экстрагируют этилацетатом. Органический слой промывают раствором хлористого натрия, сушат сульфатом магния и растворитель упаривают. Остаток кристаллизуют из подходящего растворителя.

Иногда Вос-аминокислоты выделяют в виде хорошо кристаллизующихся дициклогексиламмониевых солей (ДЦГА-солей). Для использования в синтезе пептидов их необходимо перевести в свободные Вос-аминокислоты.

М е т о д и к а 99. Превращение ДЦГА-солей Вос-аминокислот в Вос-аминокислоты

Навеску ДЦГА-соли Вос-аминокислоты суспендируют в делительной воронке в этилацетате, используя 100 мл последнего на 20 г соли. К суспензии добавляют 1,2 эквивалента 1 н. раствора серной кислоты или 1 н. раствора бисульфата натрия и встряхивают до полного растворения соли. Водный нижний слой отделяют и дважды экстрагируют этилацетатом. Соединенные вытяжки промывают водой и насыщенным раствором хлористого натрия, сушат безводным сульфатом магния, и растворитель удаляют в вакууме. Полученный продукт можно использовать для синтеза пептидов.

П р и м е ч а н и е. Если раствор Вос-аминокислоты в этилацетате плохо отмыт от кислоты, то при его дальнейшем промывании раствором хлористого натрия в осадок начинает выпадать слабо растворимая соль хлоридрата дициклогексилamina.

Другие методы синтеза Вос-аминокислот

При получении Вос-аминокислот по методу Шнабеля используют автоматитратор. В более простых методах pH раствора поддерживают добавлением триэтиламина. При этом в качестве растворителя применяют водно-диоксановые растворы или смесь воды с диметилформамидом. Рассмотрим две такие методики.

М е т о д и к а 100. Синтез Вос-аминокислот с триэтиламином в водно-диоксановом растворе [192]

Аминокислоту в количестве 10 ммоль растворяют в 15 мл воды, прибавляют 4,2 мл триэтиламина и раствор 1,7 мл Вос-азиды в 15 мл диоксана. Часто при добавлении последнего выпадает осадок соли. Реакционную смесь размешивают до тех пор, пока раствор не станет прозрачным. Диоксан удаляют на роторном испарителе, а водный раствор экстрагируют эфиром, охлаждают и подкисляют охлажденным рас-

Т а б л и ц а 19. Время реакции и выход Вос-аминокислот [192]

Аминокислота	Время реакции, ч	Выход, %
L-Аланин	8	98
L-Аспарагин	40	69
L-Валин	8	94
L-Глутаминовая кислота	12	87
Глицин	2	91
L-Фенилаланин	13	94

твором соляной кислоты. Выпавшее масло экстрагируют этилацетатом и обрабатывают, как указано в методике 85.

Время проведения реакции и выход Вос-аминокислот даны в табл. 19.

М е т о д и к а 101. Синтез Вос-аминокислот

в смеси вода - ДМФА [193]

К раствору 10 ммоль аминокислоты в 5 мл воды и 4 мл ДМФА прибавляют 1,7 мл (12 ммоль) Вос-азиды и 3,1 мл (22 ммоль) триэтиламина и размешивают от 4 до 72 ч при комнатной температуре. После этого к реакционной смеси добавляют 25 мл воды, а избыток Вос-азиды экстрагируют эфиром (2x50 мл). Водный слой подкисляют до pH 2-3 раствором бисульфата калия, и Вос-аминокислоту извлекают этилацетатом (4x20 мл). Вытяжки соединяют, промывают водой (3x25 мл) и сушат сульфатом натрия. Органический растворитель удаляют в вакууме, и остаток кристаллизуют из подходящего растворителя. В табл. 20 представлен выход Вос-аминокислот, синтезированных этим методом, и время проведения реакции.

Т а б л и ц а 20. Время реакции и выход Вос-аминокислот [193]

Аминокислота	Время реакции, ч	Выход, %
L-Аспарагин	48	85
ω-Нитро-L-аргинин	72	85
L-Валин	18	85
L-Глутамин*	48	55
Глицин	4	92
ди-Вос-L-гистидин	24	100
L-Изолейцин	18	82
L-Лейцин	4	100
L-Метионин	18	75
L-Пролин	10	88
L-Серин-ДЦГА-соль	18	70
L-Треонин	18	75
L-Триптофан	18	84

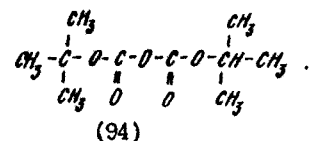
Окончание табл. 20

Аминокислота	Время реакции, ч	Выход, %
O-Бензил-L-тирозин	48	75
S-Бензил-L-цистеин	18	86
L-Фенилаланин	18	100

* Реакцию вели при 45 °C.

Синтез Вос-аминокислот с использованием ди-трет-бутилпиروкарбоната

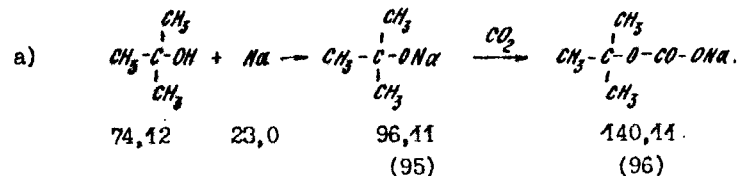
В 1972 г. Тарбелл с соавт. [194] предложил для введения Вос-группы использовать новый реагент ди-трет-бутилпирокарбонат (Boc_2O)

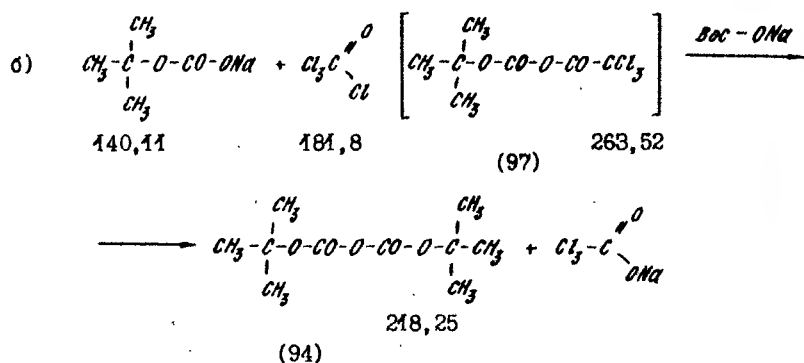


При взаимодействии этого соединения с эфирами аминокислот и при последующем омылении продукта реакции получаются Вос-аминокислоты. В работах [185-187, 197] описаны безосложненный метод синтеза ди-трет-бутилпирокарбоната и условия получения практически всех Вос-аминокислот, обычно используемых для синтеза пептидов. Вос-аминокислоты получаются при взаимодействии дикарбоната (94) с аминокислотами в водно-органических смесях при температуре 20-45 °C в течение 0,5-2 ч. Исследуя применимость ди-трет-бутилпирокарбоната для синтеза Вос-аминокислот, Мордер с соавт. [196] назвал его идеальным реагентом для синтеза пептидов.

М е т о д и к а 102. ди-трет-Бутилпирокарбонат [185]

Синтез этого соединения включает три стадии: получение трет-бутилата натрия (95), превращение его в трет-бутилкарбонат (96) и, наконец, синтез ди-трет-бутилпирокарбоната (94).





Методика 103. Синтез ди-трет-бутилпиروкарбоната [185]

1. В термостойкую коническую колбу вместимостью 1 л вносят 34,5 г (1,5 моль) металлического натрия и 230 г сухого толуола. Колбу закрывают обратным воздушным холодильником, снабженным хлоркальциевой трубкой и нагревают до тех пор, пока натрий не расплавится. Холодильник быстро заменяют хорошо приткнутой корковой пробкой, оборачивают колбу асбестовой тканью и интенсивно встряхивают в течение нескольких минут. При этом образуется мелкая суспензия натрия. Пробку заменяют хлоркальциевой трубкой, асбестовую ткань удаляют и колбу оставляют медленно охлаждаться до комнатной температуры.

Суспензию натрия быстро переносят в трехгорлый реактор вместимостью 5 л, снабженный мешалкой с затвором из силиконового масла, термометром и обратным воздушным холодильником, закрытым очетчиком пузырьков. В колбу прибавляют 2,1 л сухого толуола и при размешивании быстро вносят 570 мл (6 моль) абсолютного трет-бутилового спирта. Содержимое колбы нагревают при температуре 80–85 °С, перемешивая до тех пор, пока весь натрий не растворится (примерно 4 ч). Затем реакционную массу охлаждают до комнатной температуры. В результате реакции образуется обильный белый осадок трет-бутилата натрия. Содержимое реактора можно оставить на ночь при комнатной температуре с целью защиты от попадания влаги из воздуха.

2. Для осуществления второй стадии реакции вместо термометра в реактор вставляют барометр и при интенсивном перемешивании пропускают в течение 3 ч углекислый газ, который для высушивания предварительно проходит через оклянку о концентрированной серной кислотой. По мере продувания углекислого газа в колбе образуется прозрачный гель трет-бутилоксикарбоната натрия.

3. В реактор добавляют 170 мл неперегнанного сухого ДМФА, реакционную смесь охлаждают до 8–10 °С и из капельной воронки добавляют в течение 1,5 ч при медленном перемешивании раствор 80 мл (0,72 моль) хлорангидрида трихлоруксусной кислоты в 80 мл сухого толуола. Ввиду высокой вязкости раствора следует пользоваться более эффективной лопастной мешалкой. После окончания подачи хлорангидрида температуру реакционной смеси поднимают до 20 °С и интенсивно размешивают еще 2 ч при этой температуре. В результате реакции выпадает большое количество солей. Содержимое реактора охлаждают до 15–17 °С, добавляют 1,3 л воды и тщательно размешивают. После отстаивания и расслоения жидкости нижний водный слой удаляют с помощью водоотруйного насоса через трубку с оттянутым концом. Органический растворитель снова промывают водой (по 1,3 л) до pH 7,0 и 1 л насыщенного раствора хлористого натрия. Толуольный раствор сушат 150 г безводного сульфата натрия в колбе вместимостью 3 л. После фильтрования толуол отгоняют в вакууме на роторном испарителе при 50–60 °С, а остаток перегоняют в вакууме, собирая фракцию, кипящую при 72–76 °С (0,4–0,53 кПа). При перегонке температура в холодильнике не должна быть ниже 20–25 °С. Выход ди-трет-бутилпирокарбоната – 100–110 г (64–70 %). Это – прозрачная вязкая жидкость с характерным запахом; при охлаждении затвердевает, т.пл. 23–24 °С, т.кип. 75–78 °С (0,4–0,53 кПа, 56–57 °С) (13,3 Па). Ди-трет-бутилпирокарбонат устойчив при хранении.

Примечания: 1. При добавлении хлорангидрида трихлоруксусной кислоты в реакционную массу может произойти закупорка трубки, погруженной в гель трет-бутилкарбоната натрия. Поэтому на кончик капельной воронки надевают плотный тефлоновый шланг, который при размешивании содержимого колбы вибрирует, что предохраняет его от забивания. 2. При перегонке ди-трет-бутилпирокарбоната его не следует перегревать, т.е. поднимать температуру выше 85 °С, поскольку может произойти его разложение.

Методика 104. Общий способ получения Вос-аминокислот с использованием ди-трет-бутилпирокарбоната [197]

К раствору 10 ммоль аминокислоты в 10 мл раствора едкого натра добавляют раствор 0,5 г NaHCO_3 в 5 мл воды, 10 мл изопропилового спирта и 3 мл ди-трет-бутилпирокарбоната. Смесь размешивают 2 ч при комнатной температуре, разбавляют водой до 50 мл, и избыток реагента экстрагируют петролейным эфиром (2х20 мл). Водный раствор под-

кислят лимонной кислотой, экстрагируют этилацетатом (2х15 мл). Соединенные вытяжки промывают насыщенным раствором хлористого натрия, сушат сульфатом магния, и этилацетат удаляют на ротормном испарителе. Остаток кристаллизуют из подходящего растворителя или выделяют в виде дигликогексиламмонийной соли.

Методика 105. β -Бензиловый эфир трет-бутилоксикарбонил-аспарагиновой кислоты [187]

Раствор 2,23 г (10 ммоль) β -бензильового эфира L -аспарагиновой кислоты в смеси 30 мл диоксан - вода (2:1) и 10 мл 1 н. $NaOH$ размешивают и охлаждают до 0 °C, а затем прибавляют 2,4 г (11 ммоль) ди-трет-бутилпинокрбоната и реакционную смесь размешивают 30 мин при комнатной температуре. Диоксан упаривают в вакууме, водный раствор охлаждают, прибавляют этилацетат, а затем подкисляют 1 н. раствором бисульфата калия до pH 2-3. Водную фазу отделяют и промывают этилацетатом. Соединенные вытяжки сушат сульфатом магния, этилацетат отгоняют на ротормном испарителе, а оставшийся продукт кристаллизуют из смеси этилацетат - петролейный эфир. Выход 8 г (83 %), т.пл. 100-101 °C.

Методика 106. трет-Бутилоксикарбонил- ω -нитро- L -аргинин [187]

К раствору 1,5 г $KHCO_3$ в 10 мл воды прибавляют 2,2 г (10 ммоль) ω -нитро- L -аргинина, затем добавляют 10 мл ДМФА и 2,7 г ди-трет-бутилпинокрбоната и реакционную смесь размешивают 2 ч при комнатной температуре. После окончания реакции избыток ди-трет-бутилпинокрбоната экстрагируют эфиром, а водную фазу подкисляют лимонной кислотой до pH 3,0; продукт экстрагируют этилацетатом (один раз 30 мл и дважды по 15 мл). Органическую фазу промывают насыщенным раствором хлористого натрия, сушат сульфатом магния и этилацетат упаривают на ротормном испарителе. Остаток раотируют с эфиром, а образовавшийся аморфный продукт отфильтровывают и сушат. Выход 2,7 г (85 %), т.пл. 119-120 °C, $[\alpha]_D^{25} = -6,0^{\circ}$ (с=2, ДМФА).

Условия синтеза и выход Вос-аминокислот при использовании ди-трет-бутилпинокрбоната указаны в табл. 21.

Большую работу по оптимизации синтеза Вос-аминокислот провели В.Ф.Позднеев с соавт. [186]. Исследуя влияние растворителей, оснований и температуры реакции, авторы нашли условия получения Вос-аминокислот с очень высокими выходами.

Т а б л и ц а 21. Условия синтеза Вос-аминокислот с помощью ди-трет-бутилпинокрбоната [187, 196, 197]

Вос-аминокислота	Температура реакции, °C	Растворитель	Время реакции, ч	Выход, %
L -Аланин	20	Изопропиловый спирт - вода (2:1)	2	84
L -Аргинин	20	То же	1	96
L -Нитроаргинин	40	ДМФА - вода	2	85
β -Бензиловый эфир L -аспарагиновой кислоты	20	Диоксан - вода (2:1)	0,5	83
L -Аспарагин	45-50	ДМФА - вода	3	77,5
L -Валин	20	Диоксан - вода (2:1)	0,5	88
Глицин	20	Изопропиловый спирт - вода (2:1)	2	95
γ -Бензиловый эфир L -глутаминовой кислоты	20	Диоксан - вода (2:1)	0,5	86
N^m -Вос- L -гистидин	20	Изопропиловый спирт - вода (2:1)	2	95
L -Лейцин	20	То же	2	96
L -Пролин	20	" "	2	95
L -Серин-ДЛГА-соль	40	" "	1	85
L -Треонин-ДЛГА-соль	40	" "	1	95
L -Триптофан	20	" "	2	94
L -Тирозин-ДЛГА-соль	20	" "	2	84
L -Фенилаланин	20	" "	2	86
β -Вос- L -цистеин	20	" "	2	72

Т а б л и ц а 22. Физико-химические характеристики Вос-аминокислот

Вос-аминокислота	Т.пл., °C	$[\alpha]_D^{25}$, градус	Растворитель для кристаллизации
L -Аланин	83-84	-22,4 (с=1, уксусная кислота)	Эфир - петролейный эфир
L -Аланин-ДЛГА-соль	144-145		
L -Аргинин	181-182	-5,6 (с=1, уксусная кислота)	ТФ
ω -Нитро- L -аргинин	123-125	-5,9 (с=2, ДМФА)	Этилацетат
ω -Тозил- L -аргинин	96-97	-3,6 (с=4, ДМФА)	
L -Аспарагин	174-176	-8,5 (с=1, ДМФА)	Вода
L -Аспарагиновая кислота	114-116	-2,9 (с=1, ДМФА)	Этилацетат - петролейный эфир
β -Бензиловый эфир L -аспарагиновой кислоты	99-100	+8,2 (с=2, уксусная кислота)	То же
β -Бензиловый эфир L -аспарагиновой кислоты-ДЛГА-соль	130	+17,1 (с=1, метанол)	
L -Валин ДЛГА-соль	140,5-141	0,0 (метанол)	
L -Валин	77-79	-6,3 (с=1, уксусная кислота)	" "
L -Глутаминовая кислота	110-112	-15,2 (с=1, уксусная кислота)	

Вос-аминокислота	Т.пл., °C	$[\alpha]_D^{25}$, градус	Растворитель для кристаллизации
β -Бензиловый эфир L-глутаминовой кислоты	65-66	-13,4 (c=1, CHCl ₃)	
β -Бензиловый эфир L-глутаминовой кислоты	138-139	+11,9 (c=1, MeOH)	
ДЦГА-соль L-Глутамин	116-118	-2,9 (c=1, спирт)	Этилацетат
Глицин	94-95	-	Этилацетат - петролейный эфир
L-Гистидин	191-191,5	-10,6 (c=1, ДМФА)	
N ^{III} -Бензил-L-гистидин	189-190	+23,2 (c=1, MeOH)	
N-трет-Бутилоксикарбонил-L-гистидин-ДЦГА-соль	157-159	+17,6 (c=2, CHCl ₃)	
L-Изолейцин	66-68	+2,5 (c=1, уксусная кислота)	Петролейный эфир
L-Изолейцин-ДЦГА-соль	127-128	+6 (c=1,5, ДМФА)	
L-Лейцин	86-87	-24 (c=1, уксусная кислота)	" "
L-Лизин	202-203	-10,7 (c=0,85, уксусная кислота)	
ϵ -Карбобензоокси-L-лизин-ДЦГА-соль	110-111	-9,3 (c=1, уксусная кислота)	Этилацетат
L-Метионин	47-49	-20 (c=1,3, MeOH)	
L-Метионин-ДЦГА-соль	134-135	+16 (c=1, ДМФА)	
L-Фенилаланин	86-88	-4 (c=1, уксусная кислота)	Этилацетат - петролейный эфир
L-Серин	75-78	-4,6 (c=1, уксусная кислота)	То же
L-Серин-ДЦГА-соль	142-144	+13,3 (c=3, MeOH)	
O-Бензил-L-серин	60-62	+20,4 (c=2, 80 %-ный спирт)	
O-Бензил-L-серин-ДЦГА-соль	135,5-136	+24,3 (c=2, MeOH)	
L-Треонин	79-81	-9,2 (c=0,2, уксусная кислота)	Петролейный эфир
L-Треонин-ДЦГА-соль	154-155	+11,4 (c=1, MeOH)	
O-Бензил-L-треонин	115-116	+15,8 (c=1,1, MeOH)	
L-Триптофан	135-137	-24,5 (c=1, уксусная кислота)	Этилацетат - петролейный эфир
L-Тирозин	136-138	+3,9 (c=2, уксусная кислота)	
L-O-Бензил-L-тирозин	107-109	+25 (c=2, спирт)	То же
L-Тирозин-ДЦГА-соль	205-208	+3,8 (c=1, уксусная кислота)	
O-трет-Бутиловый эфир L-тирозина-ДЦГА-соль	134-136	+24,4 (c=0,5, ДМФА)	
L-Фенилаланин-ДЦГА-соль	210-212	+29,2	
S-Бензил-L-цистеин	63-65	-41 (c=1, MeOH)	Эфир - петролейный эфир
S-Бензгидрил-L-цистеин	96-97	-14,8 (c=2, MeOH)	

В табл. 22 представлены характеристики трет-бутилоксикарбонил-аминокислот, синтезированных различными методами.

Отщепление трет-бутилоксикарбонильной группы

Вос-группа легко отщепляется в кислой среде с образованием изобутилена и углекислого газа. Для деблокирования Вос-пептидов или Вос-аминокислот используют 1-4 н. раствор HCl в диоксане; при плохой растворимости пептидов вместо диоксана применяют уксусную кислоту или метанол. Вос-группа легко удаляется раствором бромистого водорода в уксусной кислоте, а также безводным фтористым водородом. Эта защитная группа отщепляется также обработкой соответствующего производного пептида трифторуксусной кислотой в течение 30 мин. Для предотвращения побочной реакции - алкилирования остатка триптофана - в условиях удаления Вос-группы применяют добавки 2 % меркаптоэтанола или дитиотрептола. Рекомендуется отщеплять Вос-группу у триптофансодержащих пептидов 98 %-ной муравьиной кислотой в течение 3,5 ч [198].

В условиях удаления Вос-группы при комнатной температуре расщепляются трет-бутиловые сложные эфиры, а также некоторые кислотолabile группы, например такие, как о-нитро-фенилсульфенильная, тритильная, но карбобензооксигруппа не удаляется. Это позволяет избирательно отщеплять Вос-группу при наличии Z-защиты.

Для селективного удаления Вос-группы в присутствии трет-бутиловых и п-метоксибензиловых эфиров предложено обрабатывать Вос-производные п-толуолсульфонокислотой [199].

Методика 107. Отщепление Вос-группы п-толуолсульфонокислотой [199]

К охлажденному до -10 - 0 °C раствору Вос-пептида (10 ммоль) в 50 мл эфира добавляют раствор 10 ммоль п-толуолсульфонокислоты в 10 мл спирта в течение 30 мин и выдерживают 3 ч при комнатной температуре. Спустя это время растворитель удаляют в вакууме, а остаток кристаллизуют из этилацетата.

Для пептидов время деблокирования иногда приходится увеличивать до 18-24 ч.

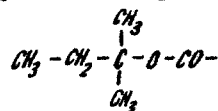
Методика 108. Отщепление Вос-группы муравьиной кислотой [200]

В 50 мл 98-100 %-ной муравьиной кислоты растворяют 5,77 г

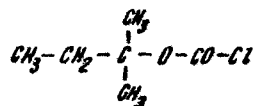
(11 ммоль) этилового эфира трет-бутилоксикарбонил-(ω -нитро)-аргинил-триптофанил-глицина и оставляют на 3,5 ч при комнатной температуре. Муравьиную кислоту затем удаляют в вакууме при 40–45 °С, остаток растворяют в воде и промывают эфиром, а водную фазу лиофилизируют. Выход продукта 4,76 г (91 %), т.пл. 107–111 °С, $[\alpha]_D^{25} = +13 \pm 0,5^\circ$ (с=2, метанол).

2.2.3. трет-Амилоксикарбонильная группа (Аос)

трет-Амилоксикарбонильная группировка (98) подобна Вос-группе

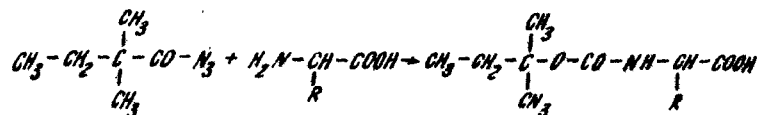


(98)



(99)

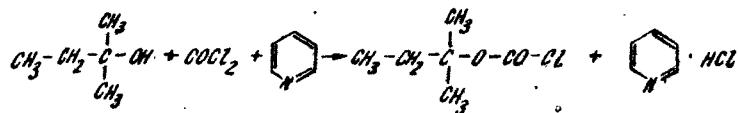
и отщепляется при тех же условиях, что и Вос-защита. Аос-группу можно вводить в аминокислоты с помощью относительно устойчивого трет-амилоксикарбонилхлорида (Аос-хлорида (99)). Для синтеза Аос-аминокислот более удобен, однако, трет-амилазидоформат (100), который получают из Аос-хлорида. Ацилирование аминокислот трет-амилазидоформатом легко протекает в водном диоксане [140]:



(100)

Получение трет-амилазидоформата [140]

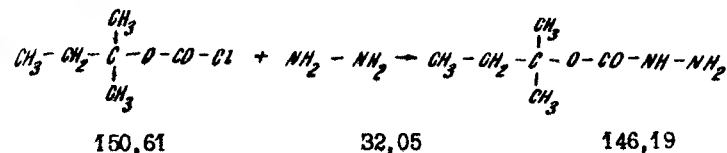
Синтез трет-амилазидоформата осуществляется в две стадии: сначала получают трет-амилхлорформат (99), который затем превращают в трет-амилазидоформат (100):



(99)

88,15

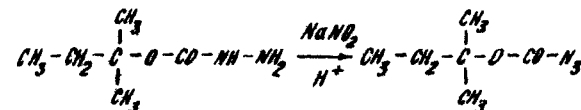
150,61



150,61

32,05

146,19



146,19

135,18

(100)

Методика 109. трет-Амилхлорформат [140]

В трехгорлый реактор вместимостью 5 л, который снабжают мешалкой, доходящей до дна, трубкой для подачи фосгена и отчетчиком пузырькового газа, помещают 1 л сухого толуола и при охлаждении льдом пропускают фосген до привеса 397 г (4 моль). Раствор охлаждают до –50 ... –60 °С и при энергичном размешивании вносят из капельной воронки 176 г (2 моль) абсолютного трет-амилового спирта, растворенного в 1,5 л сухого эфира. Одновременно по каплям прибавляют 182 г (2,3 моль) пиридина в 800 мл сухого эфира. Реакционную смесь выдерживают в течение ночи в холодильной камере при –20 °С, образовавшийся солянокислый пиридин отфильтровывают, а фильтрат упаривают в вакууме при 0 °С до объема 1200 мл. Этот раствор хранят при –20 °С.

Внимание! Получение фосгена и меры по технике безопасности при работе с ним описаны в методике 72.

Методика 110. Безводный гидразин [140]

В двухгорлую колбу вместимостью 5 л, снабженную капельной воронкой и обратным холодильником, помещают 2 кг (35 моль) СаО и 2 л толуола. Холодильник закрывают хлоркальциевой трубкой, содержащей едкий натр. Колбу осторожно нагревают на колбонагревателе и медленно в течение 3 ч прибавляют по каплям 1 кг (18 моль) 90 %-ного гидразингидрата. При добавлении реагента толуол начинает кипеть. После того как весь гидразингидрат будет добавлен, реакционную смесь кипятят в течение 10 ч, а затем вместо обратного холодильника ставят насадку Дина – Старка, в которую собирают гидразин с толуолом. Безводный гидразин отделяется в виде нижнего слоя. Выход 430 г (75 %).

Методика 111. трет-Амилкарбазат (101) [140]

К суспензии 192 г (6 моль) безводного гидразина в 500 мл сухого эфира, охлажденной до 0–2 °С, прибавляют по каплям при интенсивном размешивании раствор трет-амилхлорформата в толуоле (1,2 л – примерно 2 моль). Затем реакционную смесь перемешивают еще 1 ч при комнатной температуре и в колбу добавляют 500 мл воды. Органический слой отделяют, сушат сульфатом натрия, и эфир удаляют на ротормном испарителе при 20 °С. Остаток перегоняют в вакууме при 85–86 °С (0,53 кПа). Выход 190 г (65 %).

Методика 112. трет-Амлазидоформат (100) [140]

К насыщенному раствору нитрита натрия (22,8 г; 0,33 моль) в 30 мл воды, охлажденному до 0 °С, при размешивании прибавляют по каплям раствор карбазата (101) (43,8 г; 0,3 моль) в 250 мл 60 %-ной уксусной кислоты. Реакционную массу перемешивают еще 30 мин при комнатной температуре, затем добавляют 50 мл эфира и небольшими порциями 240 г бикарбоната натрия. Образовавшийся осадок отфильтровывают и промывают эфиром (3х25 мл). Вытяжки соединяют и сушат сульфатом магния, эфир удаляют в вакууме, а остаток перегоняют при 539,5–588,6 Па, отбрасывая фракцию, кипящую при 75–78 °С. Выход трет-амлазидоформата 42,4 г (90 %), т.кип. 81,5–82 °С (6,8–7,3 кПа).

Синтез Аос-аминокислот

Методика 113. Общий метод [140]

Смесь 10 ммоль аминокислоты, 15 ммоль трет-амлазидоформата и 25 ммоль триэтиламина в 40 мл 50 %-ного водного диоксана перемешивают 24 ч при 35 °С, после чего раствор нейтрализуют 1 н. соляной кислотой до pH 7,0 и диоксан упаривают на ротормном испарителе. Водную фазу подкисляют до pH 2,0, и продукт экстрагируют этилацетатом. Органическую фазу промывают водой, сушат сульфатом магния, а этилацетат удаляют на ротормном испарителе. Остаток кристаллизуют из подходящего растворителя. Если продукт закристаллизовать не удается, его растворяют в эфире, прибавляют вычисленное количество дициклогексильамина и ДЦА-соль выделяется в кристаллическом состоянии.

Методика 114. трет-Амлоксикарбонил- $\angle$ -аспарагин [140]

Смесь 15 г (0,1 моль) $\angle$ -аспарагингидрата, 31,4 г (0,2 моль)

трет-амилазидоформата и 42 мл (0,3 моль) триэтиламина в 50 %-ном водном диоксане (300 мл) перемешивают 2 ч при 35 °С, затем pH раствора доводят до 7,0 и диоксан удаляют на ротормном испарителе. Водный раствор подкисляют 1 н. HCl до pH 2–3 и оставляют на ночь в холодильнике. Выпавший в осадок продукт отфильтровывают, сушат и кристаллизуют из смеси спирт – петролейный эфир. Выход 20,5 г (83 %), т.пл. 151,5–152,5 °С, $[\alpha]_D^{25} = -8,2^\circ$ (с=3, этиловый спирт). Аналогично получают Аос-глутамин.

Методика 115. трет-Амлоксикарбонил- $\angle$ -нитроаргинин [140]

К суспензии 21,9 г (0,1 моль) нитро- $\angle$ -аргинина в 100 мл 1 н. едкого натра прибавляют смесь 18,8 г (0,12 моль) трет-амилазидоформата, 16,8 мл (0,12 моль) триэтиламина в 200 мл 50 %-ного водного диоксана и реакционную смесь размешивают 48 ч при 35 °С. Последующую обработку ведут, как описано в методиках 95 и 96. Масло, оставшееся после удаления органического растворителя, затвердевает после растирания с эфиром. Продукт кристаллизуют из этилацетата. Выход 20,5 г (61,6 %), т.пл. 139–141 °С, $[\alpha]_D^{25} = -28,2^\circ$ (с=2, пиридин).

Методика 116. трет-Амлоксикарбонил- γ -бензил- $\angle$ -глутаминовая кислота [140]

Суспензию 4,75 г (20 ммоль) γ -бензильового эфира $\angle$ -глутаминовой кислоты в смеси 6,28 г (40 ммоль) трет-амилазидоформата, 5,6 мл (40 ммоль) триэтиламина и 100 мл 65 %-ного водного раствора диоксана перемешивают 10 ч при 35 °С. Затем к реакционной смеси добавляют по каплям 2,8 мл (20 ммоль) триэтиламина и перемешивают еще 15 ч. Дальнейшую обработку ведут, как описано выше, и получают 8,5 г продукта. После кристаллизации из смеси этилацетат – петролейный эфир выход составляет 8,31 г (78 %).

Аналогично получают β -бензиловый эфир Аос-аспарагиновой кислоты.

В табл. 23 указаны выход Аос-аминокислот и время ацилирования аминокислот трет-амилазидоформатом. Ниже приведены примеры синтеза некоторых Аос-аминокислот. Вместо трет-амлазида В.Ф.Позднеев предложил более удобный реагент для синтеза Аос-аминокислот: ди-трет-амилпирокарбонат (Аос₂O) [201].

Физико-химические характеристики некоторых Аос-аминокислот представлены в табл. 24.

Помимо описанных выше защитных групп весьма положительную роль в развитии пептидного синтеза сыграла трифенилметильная защитная

Т а б л и ц а 23. Время синтеза и выход Асс-аминокислот [140]

Аминокислота	Время проведения реакции, ч	Выход, %
L-Аланин·ДЦГА-соль	24	85,1
L-Аспарагин	24	33,3
D-Бензил-L-аспарагиновая кислота	24	62,6
D-Нитро-L-аргинин	48	61,6
L-Глутамин	24	78,5
D-Бензил-L-глутаминовая кислота	24	78
ДЦГА-соль		
Глицин	24	78,5
L-Изолейцин·ДЦГА-соль	24	56,8
L-Лейцин	24	75,5
L-Метионин·ДЦГА-соль	24	83,0
L-Пролин	24	83,0
L-Серин·ДЦГА-соль	24	87,5
O-Бензил-L-серин·ДЦГА-соль	24	85,2
O-Бензил-L-тирозин·ДЦГА-соль	40	86,4
L-Треонин·ДЦГА-соль	24	79,3
L-Триптофан	24	74,0
L-Фенилаланин·ДЦГА-соль	24	94,8

Окончание табл. 24

Аминокислота	Т.пл., °C	$[\alpha]_D^{25}$, градус	Система для кристаллизации
L-Пролин	99-99,5	-47,6 (c=1, метанол)	Этилацетат - петролейный эфир
L-Серин·ДЦГА-соль	98-100	+13,5 (c=2,1, метанол)	То же
O-Бензил-L-серин·ДЦГА-соль	121-122	+26,6 (c=2,1, метанол)	Эфир - петролейный эфир
L-Треонин·ДЦГА-соль	110-112	+12 (c=2,8, метанол)	Этилацетат - петролейный эфир
L-Триптофан	126-127	+7,1 (c=1,2, метанол)	То же
L-Фенилаланин·ДЦГА-соль	208,5-210,5	+40,3 (c=0,67, MeOH)	Спирт - этилацетат

группа. В настоящее время она, однако, не применяется. Синтез три-аминокислот описан в монографии [17].

Среди N-защитных групп, удаляемых в очень мягких условиях, широкое применение нашли o-нитрофенилсульфенильная и 2-(п-бифенил)-изопропилокарбонильная группы.

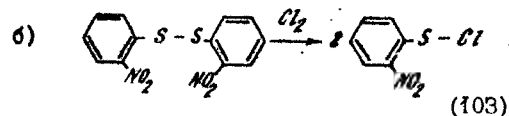
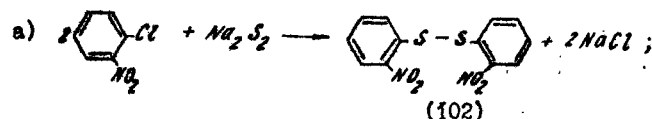
Т а б л и ц а 24. Физико-химические характеристики Асс-аминокислот [140]

Аминокислота	Т.пл., °C	$[\alpha]_D^{25}$, градус	Система для кристаллизации
L-Аланин·ДЦГА-соль	126-129	+3,7 (c=4, метанол)	Эфир - петролейный эфир
L-Аспарагин	151,5-152,5	-8,2 (c=3,4, этиловый спирт)	Спирт - этилацетат
D-Бензил-L-аспарагиновая кислота	58-60	-6 (c=2,6, этиловый спирт)	Этилацетат - петролейный эфир
D-Нитро-L-аргинин	139-141	-28,2 (c=2, пиридин)	Этилацетат
L-Валин·ДЦГА-соль	123-124	+0,9 (c=4,1, метанол)	Эфир - петролейный эфир
Глицин	84-85,5	-	Этилацетат - петролейный эфир
L-Глутамин	115,5-116,5	-19,4 (c=4,8, ДМФА)	Этилацетат - эфир
D-Бензил-L-глутаминовая кислота·ДЦГА-соль	120,5-122	+11,2 (c=1,7, этиловый спирт)	Этилацетат - петролейный эфир
L-Изолейцин·ДЦГА-соль	111-112	+2,4 (c=1,6)	Эфир - петролейный эфир
L-Лейцин	67-67,5	-17 (c=2, метанол)	Этилацетат - петролейный эфир
L-Метионин·ДЦГА-соль	112-112,5	+17 (c=3,1, метанол)	Этилацетат - петролейный эфир

2.2.4. o-Нитрофенилсульфенильная группа (Nps)

o-Нитросульфенилхлорид

Синтез o-нитросульфенилхлорида осуществляется в две стадии: сначала получают 2,2'-динитродифенилдисульфид (102), а затем его превращают в o-нитросульфенилхлорид (103):



Методика 117. Синтез 2,2'-динитродифенилдисульфида [202]

В круглодонной колбе вместимостью 250 мл, снабженной обратным холодильником, растворяют при нагревании на водяной бане 7,8 г

(0,1 моль) сульфида натрия в 150 мл спирта; к полученному раствору прибавляют 5,02 г (0,15 моль) тонкоизмельченной серы и кипятят в течение 30–60 мин до ее полного растворения.

Горячий раствор дисульфида натрия прибавляют небольшими порциями к раствору 31,4 г (0,2 моль) о-нитрохлорбензола в 30 мл спирта, находящемуся в колбе вместимостью 350 мл, которая снабжена обратным холодильником. Жидкость кипятят на водяной бане в течение 3 ч; при этом выпадает в осадок кристаллический 2,2'-динитродифенилдисульфид. Реакционную массу охлаждают до 50–60 °С, осадок отфильтровывают и промывают 50 мл бензола, 20 мл спирта, 10 мл холодной воды, 20 мл спирта и сушат при температуре, не превышающей 80 °С. Выход 21,6–22,3 г (70–75 %), т.пл. 174–180 °С.

Синтез о-нитросульфенилхлорида хлорированием 2,2'-динитродифенилдисульфида описан в работе [203]. В препаративном отношении более удобной, однако, является методика, которая была предложена Вегнером с соавт. [204], позволяющая получать чистый о-нитросульфенилхлорид с более высоким выходом.

М е т о д и к а 118. о-Нитрофенилсульфенилхлорид [204]

В трехгорлую колбу, снабженную обратным холодильником, счетчиком пузырьков, механической мешалкой и термометром, загружают 154,2 г (0,5 моль) 2,2'-динитродифенилдисульфида, 225 мл хлористого метилена и 47 мл (78 г; 0,575 моль) свежеперегнанного хлористого сульфурила. Реакционную смесь перемешивают 10 мин, затем повышают температуру до 40 °С и выдерживают при слабом кипении растворителя до полного растворения дисульфида, на что требуется примерно 2,5 ч. Колбу охлаждают до 20 °С, содержимое переносят в коническую колбу вместимостью 0,5 л и оставляют на ночь в холодильнике. Выпавший кристаллический осадок о-нитросульфенилхлорида отфильтровывают, маточник помещают в колбу с нисходящим холодильником, отгоняют 100 мл растворителя, а оставшуюся массу выдерживают в холодильнике 2 ч. Выпавший осадок отфильтровывают и соединяют с первым продуктом, сушат в вакуум-сушильном шкафу при 40–50 °С в течение 30 мин в вакууме водоструйного насоса. Выход 159 г (84 %), т.пл. 74,5–75 °С. После повторного упаривания маточника дополнительно получают еще 25 г (13 %) продукта о.т.пл. 70–72 °С.

М е т о д и к а 119. Общий метод синтеза о-нитрофенилсульфениламино кислот [205, 206]

1. К раствору 0,02 моль аминокислоты в смеси 10 мл 2 н. едкого натра и 25 мл диоксана при энергичном перемешивании добавляют в

течение 15 мин 0,022 моль о-нитросульфенилхлорида десятью равными порциями, одновременно прибавляя по каплям 12 мл 2 н. едкого натра. Затем раствор разбавляют 200 мл воды, отфильтровывают от небольшого количества образовавшегося 2,2'-динитродифенилдисульфида и подкисляют 1 н. серной кислотой до pH 2–3. Выделившееся масло кристаллизуется при растирании и охлаждении. Продукт отфильтровывают, промывают водой, сушат и кристаллизуют из смеси этилацетат – эфир или этилацетат – петролейный эфир.

2. Аминокислоту обрабатывают, как описано в пункте 1. После подкисления серной кислотой *Nps* – производное аминокислоты экстрагируют этилацетатом, эфиром или смесью этих растворителей (1:1). Органическую фазу промывают водой до нейтральной реакции и сушат сульфатом магния. После добавления дициклогексиламина ДЦГА – соль выпадает чаще в виде игл.

3. В смеси 10 мл воды и 25 мл диоксана растворяют (или оуспендируют) 20 ммоль аминокислоты. При размешивании в течение 15 мин прибавляют десятью равными порциями 22 ммоль о-нитросульфенилхлорида и одновременно прикапывают 12 мл 2 н. раствора едкого натра. Образовавшийся раствор подкисляют разбавленной серной кислотой и дальнейшую обработку ведут, как описано в пункте 2.

Т а б л и ц а 25. Условия синтеза и выход *Nps*-аминокислот [205, 206]

Аминокислота	Метод синтеза	Выход, %
L-Аланин	а	83
L-Аланин·ДЦГА-соль	б	83
β-Бензил-L-аспарагиновая кислота·ДЦГА-соль	в	70
L-Аспарагин	а	78
ω-Карбобензоксиг-L-аргинин	а	90
L-Валин	а	65
L-Валин·ДЦГА-соль	б	64
Глицин·ДЦГА-соль	б	60
L-Глутамин	а	87
α-Бензил-L-глутаминовая кислота·ДЦГА-соль	в	70
L-Изолейцин	а	70
L-Изолейцин·ДЦГА-соль	б	85
L-Лейцин·ДЦГА-соль	б	90
β-Карбобензоксиг-L-лизин·ДЦГА-соль	б	74
β-Карбобензоксиг-L-лизин·ДЦГА-соль	б	70
L-Метионин·ДЦГА-соль	б	54
L-Пролин·ДЦГА-соль	б	45
L-Серин·ДЦГА-соль	в	61
L-Треонин	а	60
L-Треонин·ДЦГА-соль	б	60
L-Тирозин·ДЦГА-соль	б	62
L-Фенилаланин	а	90
β-Бензил-L-цистеин·ДЦГА-соль	б	73

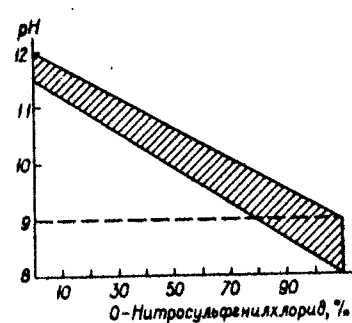


Рис. 3. Значения pH реакционной среды, поддерживаемые при ацилировании аминокислот различными количествами о-нитросульфенилхлорида

хлорида. После добавления определенного количества реагента pH реакции поддерживают в пределах значений заштрихованной части графика [204].

Методика 120. о-Нитрофенилсульфенил- α -лейцин [204]

К суспензии 13,1 г (0,1 моль) α -лейцина в 100 мл диоксана прибавляют раствор 2 н. едкого натра до pH 11,5 (около 50 мл). К реакционной смеси при перемешивании добавляют со скоростью примерно 2 мл в минуту раствор 20,9 г (0,11 моль) о-нитросульфенилхлорида в 40 мл диоксана и одновременно — раствор 2 н. едкого натра так, чтобы pH среды соответствовало меньшим значениям заштрихованной области графика, показанного на рис. 3. После того как весь о-нитросульфенилхлорид будет добавлен, приливают 1 л воды и содержимое колбы фильтруют, а фильтрат подкисляют 1 М раствором серной кислоты до pH 3,0. Выпавшее масло кристаллизуется после выдерживания 1-3 ч в холодильнике при 0-5 °С. Кристаллы отфильтровывают, промывают водой и сушат на воздухе. Выход 25,5-26,9 г (90-95 %), т.пл. 103-107 °С.

Аналогично получены α -производные пролина с выходом 90-94 % и тирозина с выходом 94-98 %.

В табл. 26 указаны свойства о-нитрофенилсульфениламинокислот. о-Нитрофенилсульфенильная группа легко удаляется в условиях отщепления карбобензокси-, трет-бутилоксикарбонил- и трет-амилокси-карбонильных защитных групп. Стандартный метод деблокирования α -производных состоит в обработке их двумя эквивалентами хлористого

Таблица 26. Физико-химические характеристики α -аминокислот

Аминокислота	Т.пл., °С	$[\alpha]_D^{25}$, градусо	Растворитель для кристаллизации
α -Аланин	128-130	-101,8 (с=2, ДМФА)	Спирт
α -Аланин·ДЦА-соль	176-178	-56,5 (с=2, MeOH)	
α -Аргинин	164	-10,8 (с=2,5, ДМФА)	
ω -Нитро- α -аргинин·ДЦА-соль	150-151	-4,5 (с=1, ДМФА)	
ω -Карбобензокси- α -аргинин	105	-	
α -Аспарагин	165-166	-119,3 (с=4, ДМФА)	Метанол
β -Бензил- α -аспарагиновая кислота·ДЦА-соль	165-166	-38,0 (с=1, ДМФА)	ДМФА
α -Валин	105	-127,8 (с=2, ДМФА)	
Глицин	147	-	
Глицин·ДЦА-соль	190-191	-	
α -Глутамин	165	-74,3 (с=2, ДМФА)	
α -Глутаминовая кислота	132-133	-84,5 (с=1, метанол)	
γ -Бензиловый эфир α -глутаминовой кислоты·ДЦА-соль	168	-34,0 (с=3,5, хлороформ)	
γ -Бензиловый эфир α -глутаминовой кислоты·ДЦА-соль	154	-25,9 (с=1, ДМФА)	
α -Гистидин	185-188	-6,9 (с=1, ДМФА)	
N^{ϵ} - α -Гистидин	140-141	+39,9 (с=1, ДМФА)	
α -Изолейцин	90-93	-102,2 (с=2, ДМФА)	
α -Изолейцин·ДЦА-соль	188-189	-53,8 (с=2, метанол)	Метанол
α -Лейцин	102-106	-99,7 (с=2, ДМФА)	
α -Лейцин·ДЦА-соль	182-183	-76,1 (с=1, ДМФА)	
N_{ϵ} -Карбобензокси- α -лизин	184-187	-29,1 (с=0,7, ДМФА)	Спирт
N_{ϵ} -Вос- α -лизин·ДЦА-соль	194-195	-43,4 (с=1,5, хлороформ)	
α -Метионин·ДЦА-соль	196-197	-34,4 (с=0,7, метанол)	Метанол
α -Пролин	107-108	-43,2 (с=0,7, ДМФА)	Этилацетат
α -Пролин·ДЦА-соль	151-154	-89,0 (с=1, ДМФА)	Спирт
α -Серин·ДЦА-соль	171-173	-111,6 (с=2, ДМФА)	
α -Треонин	138-141	-103,0 (с=0,7, ДМФА)	"
α -Треонин·ДЦА-соль	181-182	-20,4 (с=2, ДМФА)	ТГФ - эфир
α -Триптофан·ДЦА-соль	168-169	-	

Аминокислота	Т.пл., °C	$[\alpha]_D^{25}$, градусо	Растворитель для кристаллизации
L-Тирозин·ДЦГА-соль	173-175	+41,8 (с=2, метанол)	Спирт
O-Бензил-L-тирозин	136-139		
O-Бензил-L-тирозин·ДЦГА-соль	182-183	+19,6 (с=0,5, ДМФА)	
S-Бензил-L-цистеин·ДЦГА-соль	168-169	-43,5 (с=0,7, ДМФА)	
L-Фенилаланин	134-135	-47,6 (с=4, ДМФА)	

водорода в спирте или в эфире в течение 10 мин при комнатной температуре.

Другим способом отщепления *Nps*-группы является обработка *Nps*-аминокислот тиольными соединениями: тиоацетамидом, тиогликолевой кислотой и др. Следует иметь в виду, что при использовании *Nps*-группы в качестве *N*-защитной группировки пептидов исключается применение каталитического гидролиза с целью деблокирования других групп из-за стравления катализатора соединениями двухвалентной серы. Для триптофансодержащих пептидов удаление *Nps*-группы хлористым водородом не рекомендуется, поскольку образующийся при этом о-нитросульфенилхлорид способен алкилировать индольное кольцо триптофана.

Деблокирование о-нитрофенилсульфенилпептидов тиольными реагентами позволяет осуществить селективное удаление *Nps*-группы, не затрагивая таких защитных групп, как *Boc*, *Bros* и *OBu^t*.

Таблица 27. Условия отщепления *Nps*-группы различными тиосоединениями [207, 208]

Формула тиольного реагента <i>R</i>	Время реакции, мин	Состав отщепляющей среды
$\text{CH}_3-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}_2$	<5	1,5 мл CH_3OH + 0,5 мл AsOH + 100 мл (1,3 ммоль) реагента <i>R</i>
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	<5	1,6 мл CH_3OH + 0,2 мл AsOH + 0,2 мл 1 М раствора реагента <i>R</i>
$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}_2$	<5	1,5 мл CH_3OH + 0,5 мл AsOH + 100 мл (1,3 ммоль) реагента <i>R</i>
	<4	ДМФА или CH_2Cl_2 + 0,1 ммоль AsOH + 0,3-0,5 ммоль реагента <i>R</i>

Примечание. В реакцию вводили 0,1 ммоль *Nps*-аминокислоты.

В табл. 27 указаны условия отщепления *Nps*-группы различными тиосоединениями.

Удаление *Nps*-группы

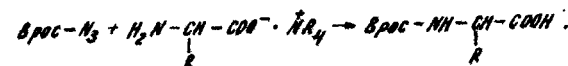
Методика 121. Удаление *Nps*-группы 2-меркаптопиридином [208]

К раствору или суспензии (10 ммоль) *Nps*-аминокислоты или пептида в метаноле, ДМФА или хлористом метиле прибавляют 30-50 ммоль 2-меркаптопиридина и 10 ммоль ледяной уксусной кислоты. Смесь выдерживают около 3 мин при 25 °C и затем растворитель удаляют на ротонном испарителе. Продукт кристаллизуют из подходящего растворителя. Выход почти количественный.

При использовании *Nps*-производных для твердофазного синтеза пептидов время обработки *Nps*-пептидполимера составляет 20-30 мин.

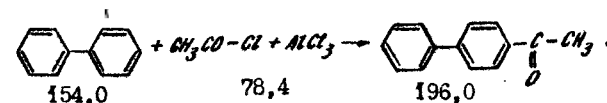
2.2.5. 2-(п-Бифенил)-изопропилоксикарбонильная группа (*Bros*) [135, 209]

Bros-группу вводят реакцией 2-(п-дифенил)-изопропилфенилкарбоната или 2-(п-дифенил)-изопропилоксикарбонилзида с аминокислотами или их эфирами в безводной среде:



Синтез 2-(п-бифенил)-изопропилоксикарбонилзида

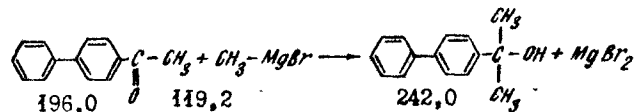
Методика 122. п-Ацетилдифенил [210]



К смеси 125 г дифенила, 40 г ацetylхлорида в 500 мл сероуглерода при хорошем размешивании добавляют в течение 10 мин 90 г безводного хлористого алюминия. Содержимое реактора нагревают 2 ч на водяной бане, а затем охлаждают и разбавляют водой. Сероуглерод и избыток дифенила отгоняют с водяным паром, а маслянистый остаток перегоняют с перегретым водяным паром, нагревая колбу с продуктом

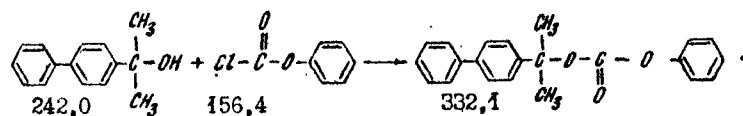
на масляной бане до 200 °С. п-Ацетилдифенил, полученный таким способом, пригоден для синтеза различных препаратов. После кристаллизации из спирта выход составляет 60-70 г (45-50 %), т.пл. 120,5 °С.

Методика 123. Диметил-п-бифенилкарбинол [211]



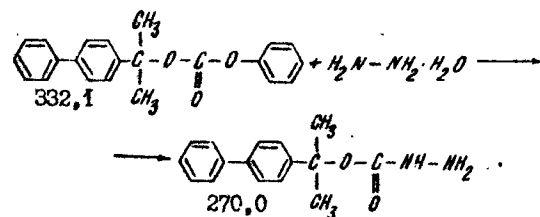
К раствору реактива Гриньяра, полученного из 48,6 г (2 моль) магния и 190 г (2 моль) бромистого метила в 250 мл абсолютного эфира, прибавляют в течение 1 ч при размешивании 371 г (1,84 моль) п-ацетилдифенила в 1,5 л сухого бензола и оставляют на ночь. Затем продукт конденсации гидролизуют разбавленной серной кислотой. Органический слой отделяют, промывают водой, сушат сульфатом магния. Растворитель удаляют в вакууме. Выход продукта 330 г (85 %). После кристаллизации из смеси бензола и гексана т.пл. 92-93 °С.

Методика 124. 2-(п-Бифенил)-изопропилфенилкарбонат [135]



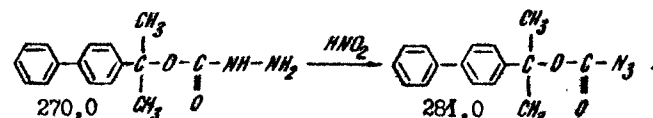
К охлажденному до -5 °С раствору 152 мл фенилхлоркарбоната в 500 мл хлористого метилена добавляют при размешивании смесь 212 г (1 моль) п-бифенилдиметилкарбинола, 1 л хлористого метилена и 120 мл пиридина. При добавлении реагентов образуется обильный осадок, который при размешивании в течение ночи при 0 °С в основном растворяется. Реакционную смесь при размешивании выливают на небольшое количество измельченного льда, разбавляют 1 л хлористого метилена. Затем органическую фазу отделяют, промывают 3 раза водой и сушат сульфатом натрия. Хлористый метилен отгоняют в вакууме. Затвердевший остаток растворяют в 1 л этилацетата при нагревании до 60 °С, растворитель упаривают на ротационном испарителе до объема 600 мл и раствор оставляют кристаллизаться при 0 °С. При этом получают первую фракцию кристаллического продукта (около 260 г) с т.пл. 115-116 °С, а из маточника после упаривания этилацетата до объема 100 мл выделяют еще 31,5 г продукта с т.пл. 114-115 °С. Общий выход 192,5 г (80 %).

Методика 125. 2-(п-Бифенил)-изопропилкарбонилгидразид [135]



Из 160 г (0,5 моль) п-бифенилдиметилкарбинола получают карбонат, как описано в методике 124, продукт реакции суспендируют в 200 мл ДМФА, при небольшом охлаждении добавляют 125 мл гидразингидрата и реакционную смесь размешивают 6 ч при комнатной температуре. После этого колбу охлаждают льдом, разбавляют 1 л воды и оставляют на ночь в холодильнике при 0 °С. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают холодным раствором 1 н. едкого натра, а затем водой до нейтральной реакции. Продукт (139 г) кристаллизуют из смеси 200 мл четыреххлористого углерода и 40 мл петролейного эфира. Выход 103 г (76 %), т.пл. 106-108 °С.

Методика 126. 2-(п-Бифенил)-изопропилоксикарбонил-азид [135]



К охлажденному до -25 °С раствору 27 г (0,1 моль) 2-(п-бифенил)-изопропилкарбонилгидразида в 270 мл ацетонитрила прибавляют холодную смесь 50 мл 6 н. соляной кислоты и 100 мл ацетонитрила. При непрерывном размешивании и охлаждении до -15 ... -20 °С прикапывают 22 мл (5 моль) раствора нитрита натрия. Через 10 мин температуру раствора понижают до -25 °С и по каплям добавляют 2 н. раствор NaNO_2 до pH 6-8. Этот раствор выливают при размешивании в 1 л воды, охлаждаемой смесью снега с солью; выпавший осадок отфильтровывают, промывают водой, а фильтрат экстрагируют эфиром. Органическую фазу сушат сульфатом натрия, эфир отгоняют на ротационном испарителе при комнатной температуре. Кристаллический остаток азиды (28,3 г) используют для получения Врос-аминокислот без дальнейшей очистки. Обычно содержание азиды в продукте составляет 84,5 %. Выход 85 % теоретического.

а) К раствору 2,85 г (17,2 ммоль) хлоридрата метилового эфира γ -пролина в 9,8 мл ДМФА прибавляют 2,4 мл (17,2 ммоль) триэтиламина, размешивают и через 2 мин добавляют 6,3 г (18,8 ммоль) 84 %-ного 2-(п-бифенил)-изопропилоксикарбонилзида в 4,9 мл ДМФА. Через 4 мин прибавляют 2,4 мл триэтиламина, а спустя 30 мин - еще 1,2 мл третичного основания и реакционную массу размешивают в течение ночи при комнатной температуре. В результате обычно получают 7,5 г частично затвердевшего масла; его растворяют в 60 мл изопропилового спирта, добавляют 11 мл 1,9 н. раствора едкого натра и размешивают 2 ч при 40 °С, а затем растворитель упаривают в вакууме. К остатку приливают 100 мл воды, раствор экстрагируют эфиром, а водную фазу подкисляют при 0 °С 1 н. лимонной кислотой до pH 3,0. Врос-пролин экстрагируют эфиром, промывают водой до pH 7,0, сушат сульфатом магния. К прозрачному раствору Врос-пролина в эфире прибавляют 3,5 мл дициклогексиламина и оставляют кристаллизаться. Выход соли 7,35 г (80 %).

б) 1,17 г (10 ммоль) γ -валина растворяют в 4,55 мл 2,2 н. раствора бензилтриметиламмонийгидроксида Тритона В в метаноле и органический растворитель упаривают в вакууме. Для удаления следов воды остаток растворяют в 10 мл ДМФА и затем растворитель отгоняют на ротонном испарителе; эту операцию повторяют дважды. Остаток растворяют в 5 мл ДМФА и смешивают при 40 °С с 3,35 г (10 ммоль) 2-(п-бифенил)-изопропилоксикарбонилзида и 2,75 мл (20 ммоль) триэтиламина, а затем реакционную массу размешивают 1 ч при 40 °С. После этого раствор разбавляют водой и экстрагируют эфиром. Водную фазу охлаждают до 0 °С и подкисляют 1 н. лимонной кислотой до pH 2-3, а продукт экстрагируют эфиром. Органическую фазу промывают водой до нейтральной реакции и сушат сульфатом магния. Прозрачный эфирный раствор смешивают с 1,2 мл дициклогексиламина; при этом сразу начинается кристаллизация продукта реакции. Эфир немного упаривают в вакууме, добавляют равное количество петролейного эфира и охлаждают до 0 °С. Выход ДЦГА-соли Врос- γ -валина составляет 3,08 г (68 %).

в) В 93 мл 2,15 н. раствора Тритона В в метаноле растворяют при 50 °С 26,2 г (0,2 моль) γ -лейцина и метанол удаляют на ротонном испарителе. Для удаления воды остаток растворяют в 60 мл ДМФА и растворитель отгоняют в вакууме. Остаток снова растворяют в 60 мл ДМФА и отгоняют на ротонном испарителе. Наконец остаток растворяют в 80 мл ДМФА и смешивают при 50 °С с 66,6 г (0,2 моль) 2-(п-бифенил)-изопропил-фенилкарбоната и реакционную массу размешивают 3 ч при 50 °С.

Для выделения продукта к смеси добавляют воду и эфир, водный слой отделяют и экстрагируют эфиром, а затем подкисляют при 0 °С 1 н. лимонной кислотой до pH 2-3 и продукт экстрагируют эфиром. Органическую фазу промывают водой до pH 7,0, сушат сульфатом магния, и эфир удаляют на ротонном испарителе при 30 °С. Остаток растирают со смесью 30 мл эфира и 100 мл петролейного эфира, кристаллический Врос- γ -лейцин отфильтровывают, сушат. Выход 52,1 г (70 %).

Физико-химические характеристики Врос-аминокислот представлены в табл. 28.

Таблица 28. Физико-химические характеристики Врос-аминокислот

Аминокислота	Метод синтеза	Выход, %	Т.пл., °С	$[\alpha]_D^{25}$, градус, (с=1, MeOH)	Система для кристаллизации
γ -Аланин	в	71	139-140	-3,0	Этилацетат - петролейный эфир
γ -Аспарагин	в	43	176-178	-8,0	Эфир
γ -Валин·ДЦГА-соль	а	49	178-180	-8,0	Изопропанол
γ -Валин·ДЦГА-соль	б	68	178-180	-8,0	"
Глицин	в	72	142-143	-	Этилацетат
Глицин·ДЦГА-соль	а	73	192-193	-	"
Глицин·ДЦГА-соль	в	65	192-193	-	"
γ -Глутамин·ДЦГА-соль	в	56	107-110	+7,0	Ацетон - петролейный эфир
γ -трет-Бутиловый эфир γ -глутаминовой кислоты·ДЦГА-соль	в	64	174-175	+15,0	Спирт
γ -Изолейцин	в	68	225-240	-2,0	MeOH - вода
γ -Лейцин	а	61	227-230	-12,0	Эфир
γ -Врос- γ -Лизин·ДЦГА-соль	а	70	Аморф.	+10,0	Эфир - петролейный эфир
γ -Лейцин	в	70	227-230	-12,0	Эфир
γ -Метионин·ДЦГА-соль	в	73	143-145	+14,0	Этилацетат - петролейный эфир
γ -Пролин·ДЦГА-соль	а	80	173-175	-12,0	Эфир - петролейный эфир
γ -Серин·ДЦГА-соль	в	72	152-152,5	+5,0	Спирт
О-трет-Бутил- γ -серин·ДЦГА-соль	в	69	180-181	+21,0	Этилацетат
γ -Тирозин	а	33	248-252	+39,0	Ацетон
γ -Тирозин	в	35	248-252	+39,0	"
γ -Треонин·ДЦГА-соль	в	63	168-170	+1,0	Метанол - этилацетат
О-трет-Бутил- γ -треонин·ДЦГА-соль	в	66	183-184	+7,0	Хлороформ - гексан
γ -Фенилаланин·ДЦГА-соль	в	59	116-119	+33,0	Этилацетат

Методика 128. Удаление Врос-группы [209]

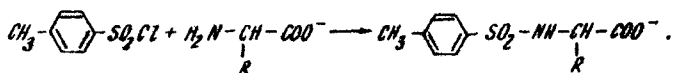
К 7 мл смеси уксусная кислота - 83 %-ная муравьиная кислота - вода (7:1:2) прибавляют 739 мг (2 ммоль) Врос- γ -лейцина и размешивают.

вают в течение 1,5 ч при 20 °С. Затем добавляют 40 мл ацетона и 1 мл пиридина и выдерживают некоторое время при 0 °С. Выпавший осадок отфильтровывают. Выход 246 мг (94 %).

2.2.6. *p*-Толуолсульфонильная группа (*Tos*)

p-Толуолсульфонильная (тозальная) группа предложена в качестве защиты аминокислот Э. Фишером еще в 1915 г., однако долгое время она не применялась. В последние годы эта группа сыграла большую роль при синтезе пептидов благодаря наличию некоторых положительных свойств: высокой стабильности в условиях удаления других защитных групп, чрезвычайной доступности *p*-толуолсульфохлорида, используемого для введения *Tos*-группы, а также благодаря способности тозальных производных давать кристаллические продукты.

Тозиламинокислоты легко получают при взаимодействии *p*-толуолсульфохлорида с аминокислотами в щелочной среде:



В настоящее время эта защитная группа почти не используется для блокирования α -аминогрупп аминокислот и пептидов из-за довольно жестких условий ее удаления (натрий в жидком аммиаке) и появления большого числа новых более лабильных защитных групп; она в основном применяется для блокирования некоторых реакционноспособных групп боковых радикалов аминокислот (см. гл. 3).

Способы получения тозиламинокислот хорошо освещены в монографии [17], поэтому ограничимся лишь одним примером синтеза тозил- α -валина.

Методика 129. Тозил- α -валин [212]

К раствору 5 г (0,04 моль) α -валина в 55 мл 1 н. едкого натра добавляют 11 г (0,06 моль) кристаллического *p*-толуолсульфохлорида. Смесь интенсивно перемешивают при комнатной температуре в течение 3 ч, затем избыток сульфохлорида отфильтровывают, а водную фазу экстрагируют эфиром и подкисляют 1 н. соляной кислотой до pH 2. Тозил- α -валин, выпавший в осадок, отфильтровывают, промывают водой, сушат и кристаллизуют из смеси этилацетат – петролейный эфир. Выход бесцветных пластинок 6,8 г (70 %), т.пл. 144 °С.

2.2.7. Трифторацетильная защитная группа (*TFA*)

Трифторацетильная группа является первой нашей практической применением *N*-защитной группой, которая удаляется в условиях мягкого щелочного гидролиза. Установлено, что при синтезе *TFA*-аминокислот прямым действием трифторуксусного ангидрида на аминокислоты может наблюдаться значительная рацемизация.

Вейганд и Гейгер [148, 213] показали, что ацилирование аминокислот трифторуксусным ангидридом в безводной трифторуксусной кислоте при низкой температуре позволяет получать соответствующие оптически чистые *TFA*-производные.

Методика 130. Трифторацетилирование аминокислот [213]

Предварительно высушенную аминокислоту (1 моль) растворяют (если необходимо, то при нагревании) в 10–15-кратном количестве безводной трифторуксусной кислоты, снабдив колбу обратным холодильником, закрытым хлоркальциевой трубкой с P_2O_5 . Раствор охлаждают до –10 °С и в течение нескольких минут добавляют при размешивании на магнитной мешалке 1,2 моль трифторуксусного ангидрида. Охлаждающую баню убирают или заменяют водяной баней с температурой не выше 10 °С, размешивание продолжают еще полчаса, а затем избыток ангидрида и ТФУ удаляют в вакууме водоструйного насоса при температуре водяной бани не выше 30 °С. Отгон собирают в колбу, охлаждаемую смесью сухого льда с ацетоном. Для удаления непрореагировавшей аминокислоты остаток растворяют в 20-кратном количестве сухого эфира и отфильтровывают от нерастворившегося материала. После отгонки эфира продукт реакции кристаллизуют из подходящего растворителя.

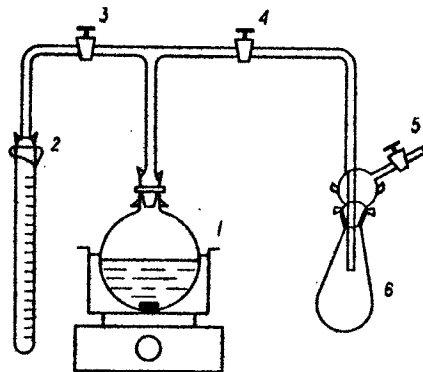


Рис. 4. Прибор для трифторацетилирования аминокислот [213]

Для реакции трифторацетилирования аминокислот удобен прибор, изображенный на рис. 4.

Раствор аминокислоты в *TFA* помещают в колбу 1, установленную на магнитной мешалке. Калиброванную трубку 2 заполняют требуемым количеством трифторуксусного ангидрида. Сосуд 6 охлаждают смесью

сухого льда с ацетоном. После того как раствор в колбе охладится до -10°C , в правой части прибора создают небольшое разрежение за счет закрывания крана 3 и открывания крана 2. После этого краны 4 и 5 закрывают, а кран 3 открывают и из трубки 2 отгоняют необходимое количество трифторуксусного ангидрида, который конденсируется в колбу 1. Затем кран опять закрывают и выдерживают реакционную смесь в течение получаса. После окончания реакции краны 4 и 5 открывают и растворитель из колбы 1 отгоняют в вакууме в приемник 6.

Ниже приведены примеры синтеза некоторых трифторацетиламинокислот.

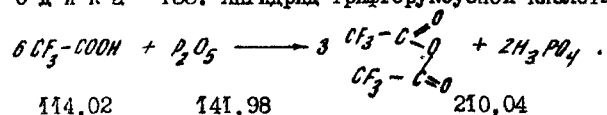
Методика 131. *N*-Трифторацетил-*L*-лейцин [213]

К раствору 0,262 г (2 ммоль) *L*-лейцина в 2,5 мл *TFA* прибавляют 0,35 мл (2,4 ммоль) трифторуксусного ангидрида при 0°C и раствор выдерживают, как было описано выше. После удаления растворителя в вакууме остаток растворяют в водном растворе бикарбоната натрия, встряхивают с эфиром и водную фазу подкисляют рассчитанным количеством разбавленной соляной кислоты. Продукт экстрагируют эфиром, органическую фазу сушат сульфатом магния и эфир отгоняют в вакууме. Остаток — густой бесцветный сироп — при хранении в течение 14 дней в вакуум-экспикаторе над КОН кристаллизуется. После кристаллизации из бензола выход составляет 0,291 г (64 %), т.пл. $71-73^{\circ}\text{C}$.

Методика 132. *N*-Трифторацетил-*L*-тирозин [213]

К раствору 1,81 г *L*-тирозина в 9 мл *TFA*, охлажденному до 0°C , прибавляют 5,4 мл абсолютного эфира, а затем — 50 %-ный избыток трифторуксусного ангидрида и реакционную смесь выдерживают 45 мин при 0°C . После этого растворитель отгоняют в вакууме, остаток продолжают кипятить с водой и затем воду отгоняют на роторном испарителе. Остаток растворяют в эфире, а тирозин, не вступивший в реакцию, отфильтровывают. Эфирный раствор слегка упаривают в вакууме и затем смешивают с подогретым толуолом; при этом сразу же начинается кристаллизация продукта, которая завершается после удаления эфира в вакууме. Выход трифторацетилтирозина 2,3 г (95,5 %), т.пл. $192-193,5^{\circ}\text{C}$.

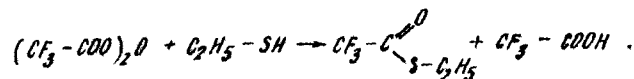
Методика 133. Ангидрид трифторуксусной кислоты [214]



В двугорбую круглодонную колбу вместимостью 0,5 л, снабженную каплевой воронкой и холодильником, помещают 200 г (1,4 моль) P_2O_5 ; сразу же в колбу добавляют 80 г (0,7 моль) *TFA* и смесь осторожно нагревают на масляной бане до 100°C . Образующийся ангидрид трифторуксусной кислоты отгоняют в течение 1-1,5 ч. Полученный продукт еще раз перегоняют с дефлегматором. Выход 70 г (90 %), т.кип. $39-40^{\circ}\text{C}$.

Хорошим реагентом для синтеза *TFA*-аминокислот является предложенный Шелленбергом и Кальвином тиоэтиловый эфир трифторуксусной кислоты [215]. Он легко ацилирует аминокислоты по методу Шотен — Баумана в водно-щелочной среде; выходы *TFA*-аминокислот при этом удовлетворительные (50-80 %).

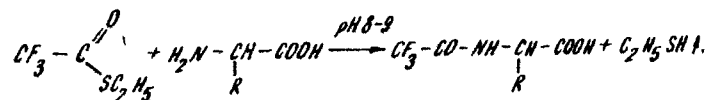
Методика 134. Тиоэтиловый эфир трифторуксусной кислоты [215]



210,04 62,13 158,11 114,02

К охлажденному до 0°C этилмеркаптану (31 г; 0,5 моль) добавляют по каплям в течение 1 ч при размешивании и охлаждении 130 г (0,62 моль) трифторуксусного ангидрида. Реакционную колбу снабжают обратным холодильником, защищенным хлоркальциевой трубкой, оставляют на 1 ч при комнатной температуре, а затем нагревают 3 ч при 100°C . Продукт промывают холодным 5 %-ным раствором КОН (2х500 мл) и затем — водой, сушат сульфатом магния и перегоняют, отбирая фракцию, кипящую при $90,5^{\circ}\text{C}$. Выход 47,5 г (60 %).

Методика 135. Синтез *TFA*-аминокислот при помощи тиоэтилового эфира трифторуксусной кислоты [215]



Внимание! Реакцию необходимо проводить в хорошо вентилируемом вытяжном шкафу.

К раствору аминокислоты в 1 эквиваленте 1 н. едкого натра добавляют тиоэтиловый эфир трифторуксусной кислоты (0,2 мл тиоэфира на 1 ммоль аминокислоты); молярное соотношение (1,6:1). Колбу закрывают пришлифованным краном с газоотводной трубкой, конец которой вставлен в отверстие вытяжной шахты, и встряхивают на механической

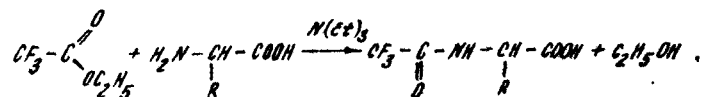
мешалке в течение 24 ч. Затем раствор подкисляют концентрированной соляной кислотой при охлаждении на ледяной бане; выпавший продукт отфильтровывают.

В табл. 29 представлены некоторые константы *TFA*-аминокислот. *TFA*-аминокислоты можно получать, используя в качестве ацилирующего агента метиловый [216] или этиловый эфир [217] трифторуксусной кислоты в присутствии органических оснований.

Т а б л и ц а 29. Физико-химические характеристики *TFA*-аминокислот

Аминокислота	Т.пл., °C	$[\alpha]_D^{25}$, градус
L-Аланин	66-68	-60,6 (с=2, вода)
L-Аргинин	130-132	-3,5 (с=2, вода)
L-Аспарагин	164-165	-
L-Валин	86-88	-15,2 (с=2, вода)
L-Глутаминовая кислота	192	-23,8 (с=2,5, вода)
Глицин	117-119	-
L-Лейцин	72-75	-39,5 (с=2, этанол)
L-Метионин	69-71	-22,7 (с=2, вода)
L-Пролин	46-48	-60,3 (с=1, бензол)
L-Триптофан	162-163	-
L-Тирозин	192,5-193,5	+45,0 (с=2, вода + 1 экв. NaOH)
S-Бензил-L-цистеин	84-85	-84,5 (с=1,5, 99 %-ный спирт)

М е т о д и к а 136. Трифторацетилирование аминокислот и пептидов этилтрифторацетатом [217]



В хорошо высушенную колбу вместимостью 25 мл, снабженную тефлоновой мешалкой с каучуковым уплотнением, помещают 10 ммоль аминокислоты или пептида (при работе с цистеином используют 5 ммоль аминокислоты); воздух из колбы вытесняют сухим аргоном и добавляют 5 мл абсолютного метанола. При непрерывном размешивании добавляют 2,4 мл (10 ммоль) триэтиламина (при ацилировании аспарагиновой кислоты используют 2,8 мл основания), а затем - 1,5 мл (12,5 ммоль) этилтрифторацетата. Реакционную массу энергично размешивают при комнатной температуре до полного растворения аминокислоты (время проведения реакции указано в табл. 29). После этого прибавляют 5 мл метанола, колбу охлаждают до 10 °C и прибавляют 4 г (при синтезе *TFA*-AspOH - 6 г) смолы дауко-50 в H^+ -форме. Полученную смесь размешивают 10 мин, частицы смолы отфильтровывают, растворитель удаляют в вакууме, а остаток кристаллизуют из подходящего растворителя.

Т а б л и ц а 30. Время проведения реакции и выход *TFA*-аминокислот [217]

Аминокислота	Время реакции, ч	Выход, %
L-Аланин	25	82
L-Аспарагин	45	77
L-Аспарагиновая кислота	14	75
L-Валин	45	91
L-Серин*	34	80
L-Тирозин**	17	85
L-Триптофан	23	89
L-Цистеин	15	83
L-Фенилаланин	25	96

* В качестве растворителя использовали ДМА.

** Вместо триэтиламина применяли тетраметилгуанидин.

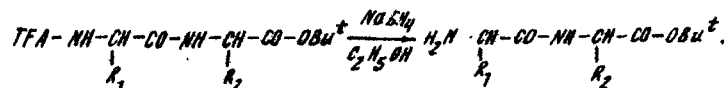
В табл. 30 указаны выход *TFA*-аминокислот и время проведения реакции.

Удаление трифторацетильной защитной группы

TFA-группа легко отщепляется при действии 0,2 н. раствора едкого натра в течение 10 мин. Для этой цели можно использовать также разбавленный водный раствор аммиака. Свободные пептиды удобно получать путем одновременного гидролиза сложноэфирной и трифторацетильной группировок щелочью; недостатком *TFA*-группы является то, что ее практически невозможно избирательно удалить, не затрагивая сложноэфирные группировки OC_2H_5 , OC_2H_5 и OBu^t .

В 1970 г. Вейганд и Францендорфер [164] предложили новый способ деблокирования *TFA*-производных действием боргидрида натрия. *TFA*-группа была успешно использована для синтеза метионинсодержащих пептидов [218].

М е т о д и к а 137. Отщепление трифторацетильной группы боргидридом натрия [164]



К раствору или суспензии 1 ммоль трет-бутилового эфира *TFA*-пептида в 5 мл охлажденного этилового спирта прибавляют 4 ммоль хорошо измельченного боргидрида натрия (при работе с пролинсодержащи-

ми пептидами используют 2 ммоль NaNH_4 и размешивают 1 ч при комнатной температуре (для пролинодержащих пептидов – 6 мин). За скоростью выделения водорода следят, закрыв реакционный сосуд U-образной трубкой с парафиновым маслом в качестве запорной жидкости. По мере протекания реакции суспензия постепенно растворяется. Для разрушения избытка боргидрида натрия колбу охлаждают и омешивают содержимое с равным объемом ацетона, размешивают в течение 15 мин, затем растворитель удаляют в вакууме, а к остатку добавляют воду для разрушения комплекса бора. Водный раствор несколько раз встряхивают с этилацетатом, органическую фазу отделяют, сушат сульфатом магния, растворитель удаляют на ротационном испарителе. Остаток кристаллизуют из подходящего растворителя. При работе с соединениями, хорошо растворимыми в воде, для разложения комплекса бора применяют насыщенный раствор K_2CO_3 , а экстрагирование продукта ведут хлористым метиленом.

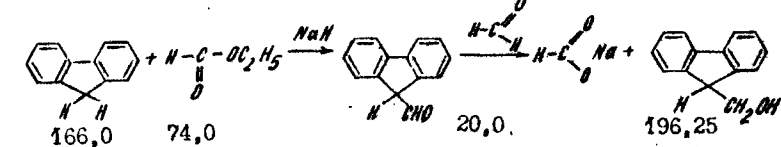
По указанной методике получен L-валин-L-валин из 207 мг (0,56 ммоль) трет-бутилового эфира TFA-L-валин-L-валина и 86 мг (2,25 ммоль) NaNH_4 в 3,5 мл этилового спирта. Выход 142 мг (93 %).

2.2.8. 9-Флуоренилметилоксикарбонильная группа (Fmoc)

Наряду с трифторацетильной группой 9-флуоренилметилоксикарбонильная группа является одной из защитных группировок, которые устойчивы к действию кислот, но легко удаляются основаниями в мягких условиях. Fmoc-группа была предложена Карпино и Ханом в 1970 г. [138]. Она находит широкое применение не только в классическом, но и в твердофазном методе синтеза [219].

Синтез 9-флуоренилметилхлорформата

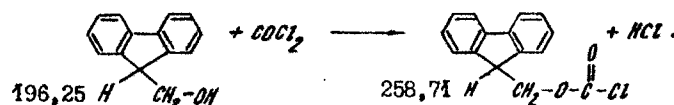
Методика 138. 9-Флуоренилметанол [220]



К 100 мл безводного эфира прибавляют 8,3 г флуорона, 8,5 мл сухого этилформата и 6,5 г гидрида натрия (57 %-ная суспензия в минеральном масле) и кипятят с обратным холодильником в течение 3 ч, а затем реакционную смесь выливают в такое количество толче-

ного льда и воды, чтобы общий объем жидкости составил около 200 мл. Содержимое колбы переносят в делительную воронку и встряхивают с 75 мл эфира; эфир отделяют и отбрасывают, а водную фазу экстрагируют 75 мл лигроина, который также отбрасывают. К водному слою добавляют 22 мл 35-40 %-ного раствора формальдегида в воде и перемешивают 1 ч при комнатной температуре. Выпавший белый осадок отфильтровывают, дважды промывают водой, сушат и кристаллизуют из лигроина. Выход бесцветных игл 9-флуоренилметанола оставляет 5,25 г (54,3 %), т.пл. 100-101 °C.

Методика 139. 9-Флуоренилметилхлорформат [221]



К охлажденному до 0 °C раствору 7,12 г фосгена в 75 мл хлористого метилена добавляют по каплям при охлаждении и перемешивании 12,8 г 9-флуоренилметанола. Размешивание и охлаждение продолжают 1 ч, а затем раствор оставляют на холоду еще на 4 ч. После этого растворитель и избыток фосгена удаляют в вакууме; оставшееся масло через несколько часов кристаллизуется. Выход неочищенного продукта 16 г (95 %). После двукратной кристаллизации из эфира получают 14,5 г (86 %) бесцветных кристаллов с т.пл. 61,5-63 °C.

Синтез 9-флуоренилметилоксикарбониламинокислот [221]

Методика 140. 9-Флуоренилметилоксикарбонил-L-триптофан

К раствору 1,58 г (7,8 ммоль) L-триптофана в смеси 10 мл диоксана и 20,5 мл 10 %-ного раствора карбоната натрия медленно добавляют при размешивании и охлаждении до 0 °C раствор 2 г (7,8 ммоль) 9-флуоренилметилхлорформата в 20 мл диоксана. Смесь размешивают при охлаждении 4 ч и при комнатной температуре 8 ч, а затем раствор выливают в 450 мл воды и встряхивают с эфиром. Водный слой охлаждают льдом, подкисляют концентрированной соляной кислотой до Конго красному, и реакционную смесь оставляют на ночь в холодильнике. Выпавший осадок отфильтровывают и кристаллизуют из нитрометана, а затем из смеси хлороформ-гексан. Получают 3 г (91 %) чистого Fmoc-триптофана с т.пл. 185-187 °C, $[\alpha]_D^{25} = +6,4$ (с=1, этилацетат).

К раствору 0,57 г (7,6 ммоль) глицина в 20,2 мл 10 %-ного раствора карбоната натрия добавляют при размешивании и охлаждении раствор 1,96 г (7,7 ммоль) 9-флуоренилметилхлорформата в 20 мл дioxсана. Смесь перемешивают 2 ч при комнатной температуре и затем выливают в 400 мл воды. Для удаления небольшого количества образующегося 9-флуоренилметанола и высокоплавкого полимера дибензофульвена водный раствор дважды встряхивают с эфиром. Водный слой охлаждают льдом и подкисляют концентрированной соляной кислотой по Конго красному. Выпавший бесцветный осадок экстрагируют этилацетатом, органическую фазу промывают водой, сушат сульфатом магния, и этилацетат отгоняют в вакууме. Выход бесцветного кристаллического продукта 2 г (89 %), т.пл. 173-176 °С. После кристаллизации из нитрометана получают 1,98 г (88 %) *Fluc*-глицина с т.пл. 174-175 °С.

Таблица 31. Свойства 9-флуоренилметилокси-карбониламинокислот

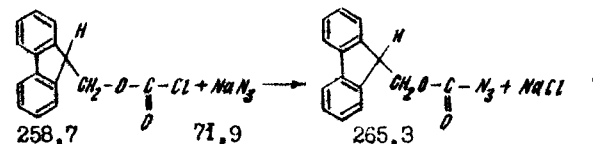
Аминокислота	Т.пл., °С	$[\alpha]_D^{20}$, градус (с=1, ДМФА)
L-Аланин	143-144	-18,0
L-Аспарагин	185-186	-10,5
β-трет-Бутиловый эфир	148-149	-20,0
L-аспарагиновой кислоты		
L-Валин	142-144	-16,0
Глицин	174-175	-
L-Глутамин	220-223	-17,0
γ-трет-Бутиловый эфир	76-80	-14,5
L-глутаминовой кислоты		
<i>Fluc</i> -Бензил- L-гистидин	142-143	-11,5
L-Изолейцин	144-146	-11,9
L-Лейцин	155-156	-24,0
<i>Nc</i> -Вос- L-лизин	123-124	-11,5
L-Метионин	118-119	-28,0
L-Пролин	114-115	-33,0
О-трет-Бутил- L-серин	126-129	+25,0
О-трет-Бутил- L-тирозин	148-151	-27,0
О-трет-Бутил- L-треонин	129-132	+15,5
L-Триптофан	185-187	-26,0
L-Фенилаланин	180-183	-37,0
β-трет-Бутил- L-цистеин	135-136	-23,0

В табл. 31 даны физико-химические характеристики *Fluc*-аминокислот, полученных указанными выше способами.

В последние годы установлено, что при ацилировании аминокислот 9-флуоренилметилхлорформатом происходит побочное образование *Fluc*-дипептидов. Так, в различных препаратах *Fluc*-глицина обнаружено от 3 до 9 % *Fluc*-Gly-Gly-OH [222]. Если вместо 9-флуоренилметилхлор-

формата использовать *Fluc*-азид, то эта побочная реакция не идет.

Методика 142. 9-Флуоренилметилазидоформат [221, 222]



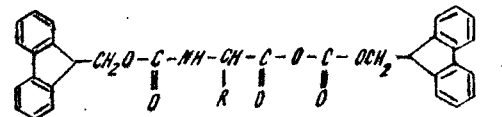
При охлаждении льдом и перемешивании к раствору 18 г (70 ммоль) 9-флуоренилметилхлорформата в 33 мл ацетона медленно добавляют раствор 6,9 г (106 ммоль) азиды в 27 мл воды. Смесь перемешивают при 0 °С 2 ч и 2 ч при комнатной температуре, затем осадок отфильтровывают, промывают водой и сушат. После перекристаллизации из ацетона выход бесцветных кристаллов составляет 16,5 г (90 %), т.пл. 83-85 °С.

Методика 143. Ацилирование аминокислот 9-флуоренилметилокси-карбонилазидом [222]

К охлажденному до 0 °С раствору 25 ммоль глицина в 66 мл 10 %-ного раствора карбоната натрия прибавляют по каплям при размешивании и охлаждении раствор 5,9 г (22,4 ммоль) *Fluc*-азиды в 65 мл дioxсана. Размешивание продолжают 2 ч при охлаждении, а затем при комнатной температуре в течение 5 дней. Реакционную смесь выливают затем в 300 мл воды, встряхивают с эфиром; водную фазу охлаждают до 0 °С и подкисляют концентрированной соляной кислотой до pH 2,0. Выпавший бесцветный осадок отфильтровывают, промывают 3 раза водой и сушат. Выход 5,2 г (78 %), т.пл. 176-178 °С.

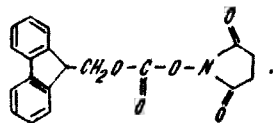
Аналогично получают *Fluc*-аланин с выходом 75 %, т.пл. 146-147 °С, $[\alpha]_D^{20} = -19,2^{\circ}$ (с=1, ДМФА).

Тщательное исследование побочных реакций, происходящих в процессе получения *Fluc*-аминокислот с использованием *Fluc*-хлорида, показало, что при получении производных стандартными методами большинство *Fluc*-аминокислот загрязняются различными, но заметными количествами *Fluc*-олигопептидов [223]. Причиной этого является образование относительно стабильных смешанных ангидридов:



В работе [223] показано, что при этом может образовываться до

20 % побочного продукта. Оптимальными условиями синтеза *Fmoc*-аминокислот с использованием *Fmoc*-хлорида являются следующие: 20-25 %-ный избыток аминокислоты по отношению к *Fmoc*-хлориду; минимальный объем диоксана по отношению к водной фазе (около 1:10); 4-кратный избыток Na_2CO_3 по отношению к аминокислоте; энергичное перемешивание при комнатной температуре. Авторы [223] не рекомендуют использовать *Fmoc*-хлорид как реагент для синтеза *Fmoc*-аминокислот. Были исследованы некоторые карбонаты, среди которых наиболее эффективным оказался 9-флуоренилметилсуцинимидоил карбонат:



Методика 144. Синтез 9-флуоренилметилсуцинимидоил карбоната [223]

102,8 г (0,4 моль) *Fmoc*-хлорида и 58 г (0,5 моль) *N*-оксосуцинимиды растворяют при эффективном перемешивании в 700 мл сухого, дважды перегнанного диоксана в трехгорлой колбе, вместимостью 2 л. Смесь охлаждают на ледяной бане и добавляют 55,75 мл (0,4 моль) триэтиламина с такой скоростью, чтобы температура не поднималась выше 10 °С. Реакция полностью заканчивается через 4 ч, после чего осадок хлоргидрата триэтиламина удаляют фильтрованием, хорошо промывают на фильтре диоксаном, раствор концентрируют в вакууме и остаток перекристаллизовывают из петролейного эфира при 4 °С. Выход 150 г (86 %), т.пл. 148-149 °С.

Методика 145. 9-Флуоренилметилоксикарбонилглицин [223]

41,25 г (0,55 моль) глицина растворяют в 10 %-ном водном растворе Na_2CO_3 (63,6 г; 0,6 моль) и добавляют к раствору 9-флуоренилметилсуцинимидоилкарбоната (168,5 г; 0,5 моль) в минимальном объеме диоксана (около 300 мл) в круглодонной колбе вместимостью 3 л. Реакционную смесь интенсивно перемешивают при комнатной температуре 22 ч, а затем разбавляют водой и дважды экстрагируют эфиром. Водную фазу подкисляют концентрированной HCl до pH 2,0 в присутствии 1,5 л этилацетата. Органическую фазу промывают 1 н. раствором HCl (150х2), водой (150х2) и сушат над сульфатом магния. Раствор фильтруют, концентрируют в вакууме, а продукт кристаллизуют добавлением петролейного эфира в горячий этилацетатный раствор

до появления муты. Выход 100 г (68 %), т. пл. 175-176 °С.

Аналогично получали *Fmoc*-L-фенилаланин, выход 91 %, т. пл. 184-185 °С.

Отщепление флуоренилметилоксикарбонильной защитной группы

Fmoc-группа количественно отщепляется при комнатной температуре аммиаком, пиперидином, морфолином или диэтиламином. В препаративном отношении чаще всего используют следующие два метода: 1) *Fmoc*-пептид перемешивают 40 мин в пиперидине или 25 мин в морфолине при комнатной температуре, затем выпавший осадок отфильтровывают, а растворитель отгоняют; 2) *Fmoc*-пептид выдерживают 2 ч при комнатной температуре в 10 %-ном растворе диэтиламина в ДМФА, после чего растворитель удаляют в вакууме.

Рассмотрим конкретный пример.

Методика 146. Глицилглицин [220]

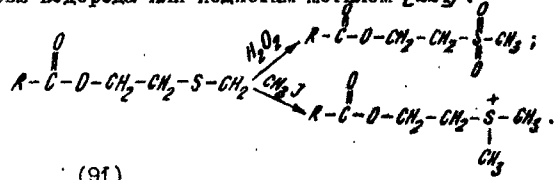
Раствор 1,3 г (3,7 ммоль) *Fmoc*-глицилглицина в 10 мл пиперидина размешивают 30 мин при комнатной температуре, а затем разбавляют 200 мл воды. Пиперидин-дибензофульвеновый аддукт, выпавший в осадок, отфильтровывают, фильтрат упаривают на ротационном испарителе, а остаток кристаллизуют из смеси этиловый спирт - вода (10:1). Выход глицилглицина 0,4 г (83 %).

В синтезе пептидов защита С-концевой карбоксильной группы аминокислот и пептидов имеет такое же значение, как и блокирование аминогрупп. Несмотря на то что при получении некоторых пептидов о упо-
ном используют слевую защиту (см. раздел 1.3.10), чаще всего, одна-
ко, в процессе наращивания полипептидной цепочки С-конец пептидов
блокируют. Защита карбоксильной группы опосредствует повышению рас-
творимости пептидов в органических растворителях.

Наиболее простым способом блокирования COOH-группы является
превращение ее в сложноэфирную группировку. О других опособах защи-
ты - превращении в бензилоксикарбонил- или трет-бутилоксикарбонил-
гидразидную группировки - говорилось в гл. 1. Преимуществом сложно-
эфирных производных аминокислот является их доступность, относитель-
ная простота расщепления и легкость, с которой многие из них превра-
щаются в амиды или гидразиды - важнейшие продукты оинтеза пептидов.

В практике пептидного синтеза для защиты карбоксильной группы
аминокислот используют алифатические (метилловые, этиловые или трет-
бутиловые), алкилароматические (бензиловые, п-нитробензиловые, 4-пи-
колиновые) и ароматические (фениловые) эфиры. Для расщепления ука-
занных производных применяют ряд методов: щелочной или кислотный
гидролиз, каталитическое восстановление над палладиевым катализато-
ром, восстановление цинком в укусной кислоте, фотолиз и другие опо-
собы, суммированные в табл. 32 и 33. Большинство С-защитных групп
удаляют в одну стадию, но некоторые из них целесообразно сначала мо-
дифицировать в более лабильные соединения, расщепляемые затем в мяг-
ких условиях.

Примером может служить β-метилтиовалильная группа, которая лег-
ко гидролизуются в щелочной ореде после предварительной обработки
перекисью водорода или иодистым метилом [224]:



В некоторых случаях С-защитную группу модифицируют так, чтобы она
превратилась в активированную группировку, и в дальнейшем ее можно
использовать для наращивания пептидной цепи. Примерами могут слу-

Т а б л и ц а 32. Защитные группы для блокирования карбоксильной группы аминокислот и пептидов

Название группы	Обозначе- ние груп- пы	Формула	Реагент для введения	Способ удаления	Примечание	Литера- турный источ- ник
Метилловые эфиры	-OMe	$\begin{array}{c} O \\ \\ R-C-OCH_3 \end{array}$	$CH_3OH + HCl,$ $CH_3OH + SOCl_2$	1 н. щелочь	Получили широкое рас- пространение; легко синтезируются. Удаля- ются водно-спиртовым раствором NaOH. При взаимодействии с гид- разинидратом легко превращаются в гидра- зиды	[227] [228]
Этиловые эфиры	-OEt	$\begin{array}{c} O \\ \\ R-C-OCH_2CH_3 \end{array}$	$C_2H_5OH + HCl,$ $C_2H_5OH + SOCl_2$	"	"	[227] [228]
Бензиловые эфиры	-OBzl	$\begin{array}{c} O \\ \\ R-C-OCH_2C_6H_5 \end{array}$	$PhCH_2OH + PhSO_3H$ $(PhCH_2O + N(Et)_3)$ Na/PhH (HF без- водный)	Используется весьма широко. Селективно удаляется в присут- ствии Boc-группы и OBu ^t -эфиров и других кислотнолабильных групп	Используется весьма широко. Селективно удаляется в присут- ствии Boc-группы и OBu ^t -эфиров и других кислотнолабильных групп	[229]
п-Нитробензило- вые эфиры	-ONB	$\begin{array}{c} O \\ \\ R-C-OCH_2C_6H_4NO_2 \end{array}$	$PhCH_2OH + PhSO_3H$ $(PhCH_2O + N(Et)_3)$ Na/PhH $Me_2S_2O_4$	Более устойчив к дей- ствию HBr/HOAc, чем бензиловые эфиры. Мож- но селективно удалять в присутствии бензиль- ной защиты	Более устойчив к дей- ствию HBr/HOAc, чем бензиловые эфиры. Мож- но селективно удалять в присутствии бензиль- ной защиты	[230]

Название группы	Обозначение групп	Формула	Реагент для введения	Способ удаления	Примечание	Литературный источник
Трет-Бутиловые эфиры	-OBu ^t	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagup \\ \text{C}=\text{CH}_2 \\ \diagdown \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$	1 н. HCl/THF, TPO, (NBu/MeOH, HF безводный)	Нашли очень широкое распространение. Селективно удаляются в присутствии Z-, OBzI, -OMe и других групп. Устойчивы в щелочной среде и в условиях каталитического гидрогенолиза	[231]
p-Метоксибензильные эфиры	-OBzI(OMe)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{C}-\text{OCH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OCH}_3 \end{array}$		TEA (H/Ph)	Применяется ограниченно. Селективно удаляется в присутствии Z-, -OBzI, -OMe и других групп	[232]
4-Пиколоновые эфиры	-OPic	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{C}-\text{OCH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N} \end{array}$		H/Ph (OH ⁻)	Устойчив к действию NBu/MeOH и HF безводного	[119]
Трихлоретиловые эфиры	-OTCl	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CCl}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{Cl} \\ \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$	Zn/MeOH	Возможно селективное удаление в присутствии других защитных групп	[233]
Фениловые эфиры	-OPh	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{C}-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$		CH ₃ N ₃ O ⁺ , DHPK, C ₆ H ₅ O ⁻ -S-O ₂ N ₃	Применяется редко	[234] [235]
pH 10,5						
Бензилриловые (дифенилметилвые) эфиры	-OBzH (-OBzPh)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}(\text{Ph})_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Ph} \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{Ph} \end{array}$	(Ph) ₂ CHNH ⁺ , TFA, (Ph) ₂ CHBr, N(Et) ₃ H/Ph, MeI/MeOH (OH ⁻)	Применяется редко	[236]
Триметилсилиловые эфиры	-OTMS	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{C}-\text{O}-\text{SiMe}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Me}_3\text{SiCl}, \text{Me}_3\text{Si}^+\text{F}^- \\ \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{N}-\text{SiMe}_3 \\ \\ \text{OSiMe}_3 \end{array}$	H ₂ O, KOH	Очень лабильны. Используются в специальных случаях	[237]
2-Триметилсилилэтиловые эфиры	-OTMSC	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{C}-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-\text{SiMe}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SiMe}_3 \\ \\ \text{H}_2\text{N} \end{array}$	Me ⁺ F ⁻	Устойчивы к гидролизу и каталитическому гидролированию. Расщепляются NaOH в димексане. По-видимому, перопектин, так как могут расщепляться в условиях, отличных от простых расщепления других эфиров	[238]
2-Метилтиоваловые эфиры	OMTc	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{Me} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}, \text{PhSiCl}_3 \\ \\ \text{CH}_3-\text{SCH}_2-\text{CH}_2-\text{Cl}, \text{Me или CH}_3\text{I} \\ \\ \text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3 \end{array}$	H ₂ O ₂ в щелочной среде		[239]
9-Флуорентилтиоваловые эфиры	-OFmsc	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{C}-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{Me} \end{array}$		Me ⁺ F ⁻ или пиридин в присутствии CH ₂ Cl ₂	Преломлены недавно. Возможно их селективное удаление в присутствии кислотоллабильных групп	[240]

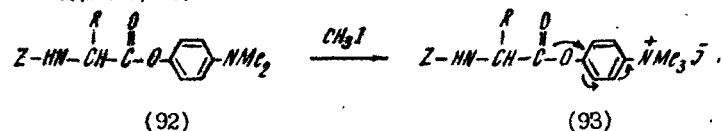
Название группы	Обозначения групп	Формула	Реагент для введения	Способ удаления	Примечание	Длительный источник
2-(1-Адамантил)-пропан-2-иловые эфиры	-Adpoc		CH_3 $\text{C}-\text{Adant}, \text{H}^+$ CH_3	TFA, HCl	Предложены недавно	[241]
2-(Трифторметил)-6-хромонилметилловые эфиры	-OTrom		H_3C $\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2$ H_3C	$\text{CH}_3, \text{CH}_2, \text{CH}_2, \text{M}_2$ $\text{NH}_2, \text{NH}_2, \text{H}_2\text{O}$	Устойчивы к действию кислотных реагентов. Селективно удаляются в присутствии Boc^+ , $-\text{OBu}^+$, Fme^+ -группы	[242]
Пентаметилбензиловые эфиры	OPHac		H_3C $\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}$ H_3C	TFA		[243]
Фенациловые эфиры	OBzH(NO ₂)		H_3C $\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}$ H_3C	Zn/AsOH, Pd/H ₂ , PhS- H ⁺		[244]
o-Нитробензилловые эфиры	BNI		H_3C $\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}$ H_3C		Уникальная защитная группировка: при облучении УФ-светом (420 нм) превращается в активированную группу	[245]
5-Бром-7-нитроиндолильная группа			H_3C $\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}$ H_3C		Принципиально новая нековалентная C-защитная группа. Устойчива в условиях облучения УФ-светом	[247]
Комплекс с пентааминокобальтом			H_3C $\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}$ H_3C	MeOH, NH ₄ SH		

Таблица 33. Способы удаления C-защитных групп

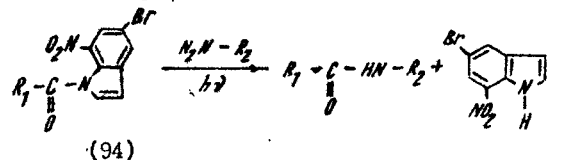
Метод удаления	Обозначение группы
Кислотами	
в жестких условиях	$-\text{OBu}^+$, $-\text{OBzH}(\text{OMe})$, $-\text{OBzH}$, $(-\text{OBpoc})$, $-\text{OBpoc}$
в мягких условиях	
Основаниями	
в жестких условиях	$-\text{OMe}$, $-\text{OBz}$, $-\text{OPh}$, $(-\text{OBzH})$, $(-\text{ONB})$, (OPic) , $(-\text{OTCz})$, $(-\text{OBzH})$, $(-\text{OTMSe})$
в мягких условиях	$-\text{OMe}$, $-\text{OBzH}$, $-\text{OPic}$, $(-\text{OBzH}(\text{OMe}))$, $(-\text{OBpoc})$, $(-\text{OTCrom})$
Каталитическое гидрирование	$-\text{OPhac}$, $-\text{OTCz}$, $(-\text{OPic})$
Восстановление цинком в уксусной кислоте	
Обработка NR_4^+F^-	$-\text{OTMSe}$, $(-\text{OBzH})$
Гидролиз или алкоголиз	OTMS
Обработка с помощью $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	$-\text{ONB}$
Обработка боргидридом натрия	Комплекс о пентааминокобальтом
Облучение УФ-светом	$-\text{OBzH}(\text{NO}_2)$, BNI

Примечание. Для групп, указанных в окобках, данный метод удаления не является стандартным.

жить трет-бутилокарбонилгидразидная группа или предложенная Ю.В.Матиним [225] п-диметиламинофенильная группа (92); последнюю после алкилирования превращают в активированный 4-(N-триметил)аминофениловый эфир (93), который используется для наращивания полипептидной цепи:



Для блокирования карбоксильной группы Паос с соавт. [226] предложили весьма интересную 5-бром-7-нитроиндольную защиту. После облучения соединения (94) УФ-светом с длиной волны 420 нм происходит активация указанной группировки и она становится способной легко и без рацемизации ацилировать аминокомпонент:



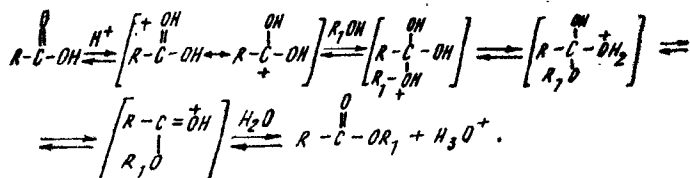
Выбор той или иной блокирующей группы диктуется схемой синте-

В табл. 32 представлены формулы С-защитных групп, используемых в пептидной химии, а в табл. 33 эти группы классифицированы по способам их удаления.

3.1. ОСНОВНЫЕ СПОСОБЫ ВВЕДЕНИЯ СЛОЖНОЭФИРНЫХ С-ЗАЩИТНЫХ ГРУПП

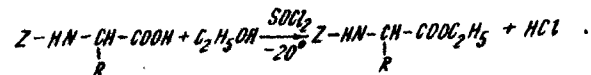
3.1.1. Этерификация спиртами в присутствии кислых катализаторов

Наиболее распространенным методом синтеза метиловых, этиловых, бензиловых, п-нитробензиловых и других сложных эфиров аминокислот является этерификация аминокислот соответствующими спиртами в присутствии кислых катализаторов: хлористого водорода, серной кислоты, п-толуолсульфокислоты, бензолсульфокислоты:

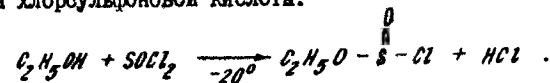


Согласно общепринятому механизму реакции на первой стадии протонируется карбоксильная группа; это повышает чувствительность к нуклеофильному реагенту, т.е. к соответствующему спирту. Так как на последней стадии образования сложного эфира отщепляется молекула воды, равновесие можно сместить вправо, в сторону образования сложного эфира, путем удаления воды из сферы реакции, например путем азеотропной отгонки; для этой цели обычно используют большой избыток спирта.

Метиловые и этиловые эфиры аминокислот чаще всего получают по методу Фишера пропусканием безводного хлористого водорода через раствор аминокислоты в абсолютном метаноле или этаноле. Более удобным является, однако, способ, согласно которому этерификацию осуществляют в присутствии хлористого тионила [228] по схеме



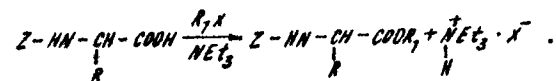
Предполагается, что реакция идет через образование промежуточного эфира хлорсульфоновой кислоты:



Синтез бензиловых, п-нитробензиловых, п-метоксibenзиловых сложных эфиров аминокислот проводят путем нагревания суспензии аминокислот в бензоле или четыреххлористом углероде с соответствующими спиртами в присутствии сульфокислот, осуществляя одновременно азеотропную отгонку образующейся в процессе реакции воды.

3.1.2. Этерификация ослей защищенных аминокислот алкилгалогенидами

Взаимодействие солей защищенных аминокислот с алкилгалогенидами наряду с описанным выше методом является общим способом получения большинства эфиров защищенных аминокислот:

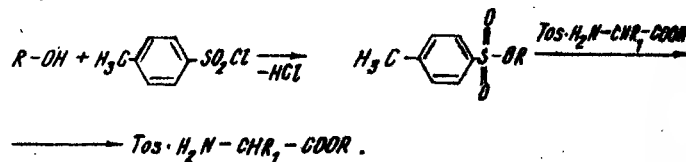


При использовании алкилхлоридов или алкилбромидов для синтеза эфиров в качестве катализатора применяют нодид натрия. Защищенные аминокислоты вводят в виде триэтиламмонийных, натриевых или серебряных солей. Метод нашел применение для получения п-нитробензиловых,

п-метоксibenзилонх, 4-пиколонх, бензгдрлльнх и другх эфиров зашщенных амонскислот.

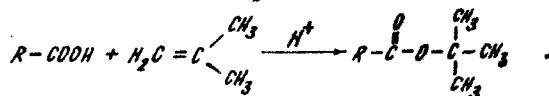
3.1.3. Этерификация амонкислот эфирами п-толуолсульфокислоты

Недавно был предложен метод мягкой этерификации амонкислот (например, триптофана), лабильных в кислой среде. В этом методе применяют сложные эфиры п-толуолсульфокислоты и соответствующего спирта [247]. Он оказался весьма удобным, поскольку не требует предварительного получения алкилгалогенидов и блокирования амонгруппы амонкислот:

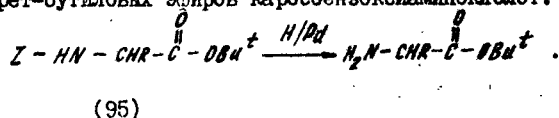


3.1.4. Этерификация амонкислот алкенами

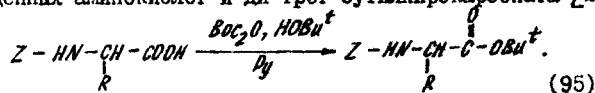
трет-Бутиловые эфиры и 2-(1-адамантил)-пропан-2-иловые эфиры амонкислот получают взаимодействием амонкислот и алкенов в присутствии кислых катализаторов:



В качестве катализатора чаще всего используют серную кислоту; трет-бутиловые эфиры амонкислот можно синтезировать также гидрогенолизом трет-бутиловых эфиров карбобензоксамонкислот:



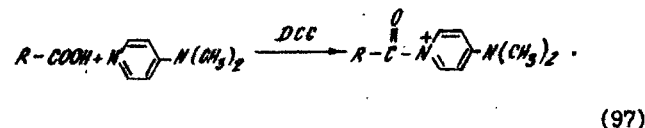
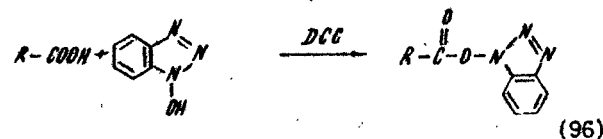
В.Ф.Позднеев предложил новый метод синтеза соединений (95) с весьма высоким выходом, основанный на взаимодействии трет-бутанола, защищенных амонкислот и ди-трет-бутилпирокарбоната [248]:



Предполагается, что реакция идет через образование промежуточного симметричного ангидрида карбобензоксамонкислоты.

3.1.5. Этерификация защищенных амонкислот в присутствии карбодимидов

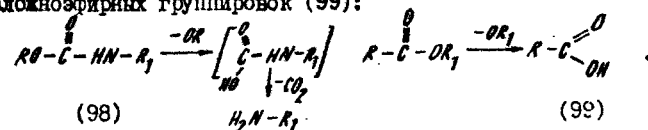
В отдельных случаях для получения фениловых эфиров амонкислот используют дициклогексилкарбодимид [234]. Этот же реагент применяют для синтеза метиловых и этиловых эфиров амонкислот в присутствии таких соединений, как 1-оксibenзотриазол [249] или 4-диметиламинопиридин; для тех же целей используют водорастворимый карбодимид и 4-диметиламинопиридин [250]. По-видимому, реакция идет через образование 1-оксibenзотриазоловых эфиров (96) или ацилпиридиновых солей (97), которые далее способны ацилировать спирты без рацемизации:



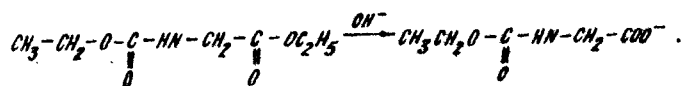
Другие методы получения сложноэфирной защиты карбоксильных групп амонкислот - перэтерификация, метод смешанных ангидридов, карбонилдипиридазолоний, метод диазоалканов - применяются довольно редко.

3.2. СВОЙСТВА ЗАЩИТНЫХ ГРУПП И СПОСОБЫ ИХ УДАЛЕНИЯ

В гл. 2 рассматривались свойства многих N-защитных групп и способы их отщепления. Ввиду того, что защитные группы уретанового типа являются сложными эфирами карбоаминовой кислоты (98), можно было бы ожидать, что они будут расщепляться в условиях деблокирования сложноэфирных группировок (99):



Эта аналогия, однако, не всегда правомочна. Так, Э.Фишер в свое время пытался полностью деблокировать этиловый эфир *N*-этилоксикарбонилглицина щелочным гидролизом, но происходило лишь деблокирование карбоксильной группы:



Устойчивость большинства защитных групп уретанового типа при щелочном гидролизе метиловых, этиловых, бензиловых и других эфиров широко используется в химии пептидов для получения защищенных пептидов со свободной карбоксильной группой. В противоположность щелочному гидролизу деблокирование пептидов кислотами или каталитическим гидрогенолизом часто сопровождается одновременным удалением как защитных групп уретанового типа, так и сложноэфирных группировок. Это также используется при синтезе пептидов.

В табл. 34 представлены некоторые *N*-защитные группы уретанового типа и *C*-защитные сложноэфирные группировки, которые удаляются в одинаковых условиях отщепления.

Т а б л и ц а 34. Условия деблокирования amino- и карбоксильных групп пептидов

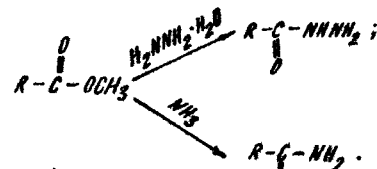
<i>N</i> -защитная группа уретанового типа	<i>C</i> -защитная сложноэфирная группа	Условия удаления защитных групп
Бензилоксикарбонильная	Бензиловый эфир	Каталитический гидрогенолиз над Pd/TiCl ₄ , 1 н. HCl в дioxане
трет-Бутилоксикарбонильная	трет-Бутиловый эфир	Цинк в уксусной кислоте
Трихлорэтоксикарбонильная	Трихлорэтиловый эфир	Трифторуксусная кислота
<i>p</i> -Метоксибензилоксикарбонильная	<i>p</i> -Метоксибензиловый эфир	То же
1-(1-Адамантил)-1-метилэтоксикарбонильная	2-(1-Адамантил)-пропан-2-иловый эфир	
2-Триметилсилилэтилоксикарбонильная	2-Триметилсилилэтиловый эфир	Тетрабутиламмоний-фторид
9-Флуоренилметилоксикарбонильная	9-Флуоренилметиловый эфир	Диэтиламин, пиперидин

Данные, приведенные в табл. 34, свидетельствуют о том, что для конструирования новых лабильных *C*-защитных сложноэфирных групп можно использовать те же спирты, которые применяются для создания лабильных *N*-защитных групп уретанового типа. Следует, однако, подчеркнуть, что скорость расщепления родственных *C*- и *N*-защитных групп может заметно различаться. Это часто используют для селективного удаления тех или иных защитных группировок. Например, Вос-группу удается се-

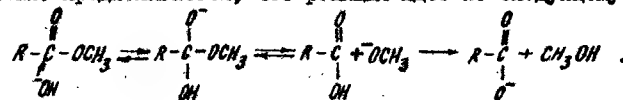
ллективно отщепить при наличии трет-бутиловой сложноэфирной группировки (см. гл. 2). Точно так же при строго контролируемых условиях каталитического гидрогенолиза удается избирательно деблокировать *N*-конец пептида, защищенный карбобензокогруппой при наличии на *C*-конце соединения сложноэфирной бензильной группировки, поскольку Кбз-группа при каталитическом отщеплении удаляется быстрее, чем происходит расщепление бензиловых эфиров. Таким образом, при создании новых *C*-защитных групп по аналогии с известными группами уретанового типа следует иметь в виду, что условия их деблокирования могут различаться весьма значительно. Способы удаления защитных групп боковых цепей тирозина, серина, треонина и гистидина также могут сильно отличаться от условий, при которых осуществляется отщепление соответствующих группировок с *N*- или *C*-конца пептидов (см. гл. 4).

3.2.1. Защитные группы, удаляемые основаниями

Среди *C*-концевых защитных групп, удаляемых основаниями, прежде всего следует рассмотреть метиловые и этиловые эфиры пептидов, препаративным способом расщепления которых является щелочной гидролиз. Эти эфиры, предложенные Курциумом и Гебелем в 1888 г. [227], сыграли большую роль в химии пептидов, что прежде всего связано с легкостью их получения, простотой расщепления, а также устойчивостью при ацидозе других защитных группировок. При обработке эфиров пептидов раствором аммиака в опыте они превращаются в соответствующие амиды; взаимодействие эфиров пептидов с гидразингидратом дает гидразиды:

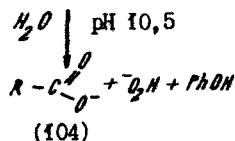
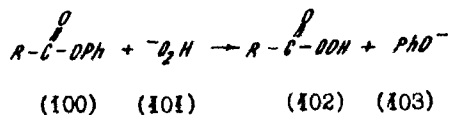


Омыление метиловых и этиловых эфиров проводят при комнатной температуре в водно-спиртовых растворах едкого натра или в смеси раствора NaOH с такими органическими растворителями, как ацетон, метанол, диоксан. Предполагается, что реакция идет по следующему механизму:



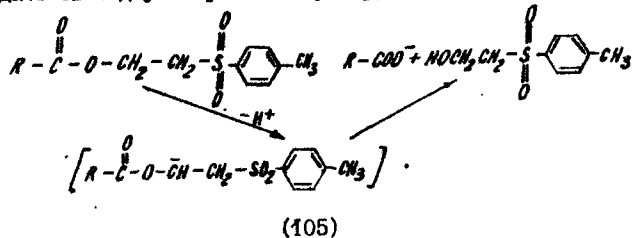
В указанных условиях расщепляются также бензиловые, *p*-нитробензиловые, бензгидриловые, 4-пиколиновые, 2-трихлорэтиловые и другие слож-

ные эфиры пептидов, хотя щелочное омыление не является основным способом их расщепления. Фениловые эфиры (100) гидролизуются в жестких условиях при pH 11. Кеннер с соавт. [234] разработал мягкий способ расщепления этих соединений – омыление в водно-ацетоновой среде щелочью и перекисью водорода в течение 20 мин; рацемизация при этом незначительна:



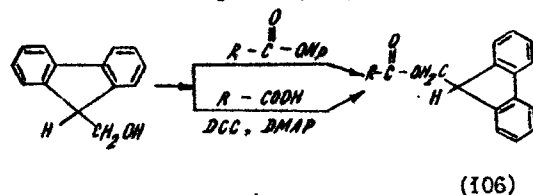
Образующийся в щелочной среде перекисный анион (101) является сильным нуклеофилом и расщепляет фениловый эфир с образованием перкарбоновой кислоты (102) и фенолят-аниона (103). Соединение (102) легко разлагается с образованием аниона кислоты (104), перекисного аниона и фенола. Фениловые эфиры были успешно использованы группой Кеннера для синтеза последовательности 1-129 лизоцима [251].

Некоторые С-защитные группы омыляются щелочами в очень мягких условиях. Так, 2-п-(толуолсульфо)этильная группа, предложенная Миллером с соавт. в 1968 г. [252], расщепляется водным раствором карбоната натрия за 2 ч или 1 н. едким натром за 3 мин. Эта группировка относится к защитным группам, представляющим собой *А*-замещенные этиловые эфиры. В щелочной среде происходит отрыв протона от *А*-углеродного атома, который активирован электроотрицательным заместителем. В результате *А*-элиминирования образующийся карбокатион (105) высвобождает свободную карбоксильную группу:

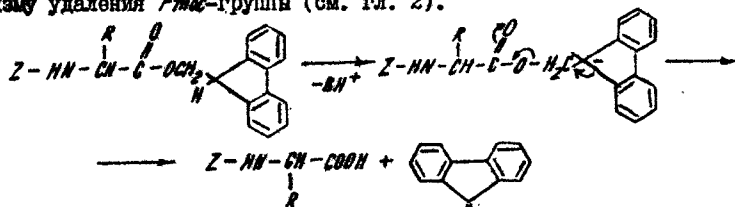


По аналогичному механизму идет расщепление 9-флуоренилметилловых эфиров, введенных недавно в практику пептидного синтеза Боданским [239]

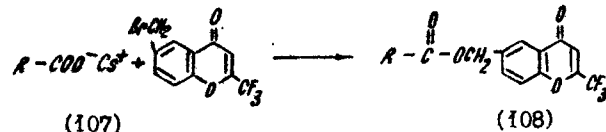
и Кеослером с соавт. [240]. Соединения (106) обычно получают перэтерификацией *о*-нитрофениловых эфиров или методом ДПЖ в присутствии 4-диметиламинопиридина [240]:



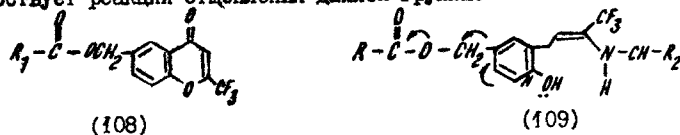
9-Флуоренилметилловые эфиры устойчивы в кислой среде, но частично расщепляются при гидрировании. Удаление С-защитной группы этих соединений проводят диэтиламиноом или пиперидином в ДМФА или хлористом метиле в течение 1-2 ч. Механизм расщепления аналогичен механизму удаления *Fmoc*-группы (см. гл. 2).

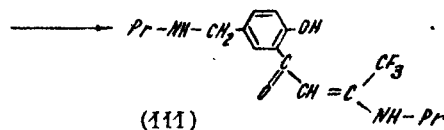
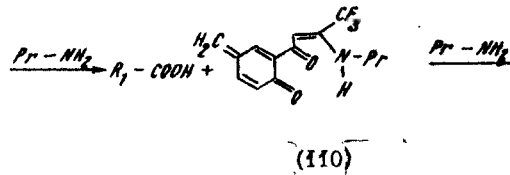


Весьма интересной С-защитной группой пептидов является предложенная Кемпом с соавт. в 1981 г. [242] 2-(трифторметил)-6-хромонилметильная (*Trtcm*) (108). Ее вводят в аминокислоты, действуя на соответствующие цезиевые соли (107) 2-(трифторметил)-6-бромметилхромоном:



Эта группа довольно легко отщепляется пропиламиноом или разбавленным спиртовым раствором гидразина и устойчива к действию эфиров аминокислот и кислых реагентов. Она инертна к действию вторичных аминов, поэтому в ее присутствии можно селективно удалять *Fmoc*-группу. Легкость разрыва хромонового кольца при действии первичных аминов способствует реакции отщепления данной группы:



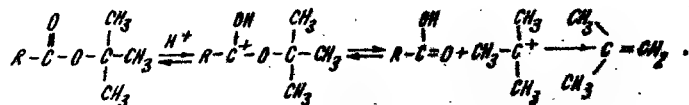


Промежуточное соединение (109) подвергается реакции элиминирования с образованием свободной кислоты и хинона (110), который действием избытка пропиламина превращается в соединение (111). *Tsotm*-группа устойчива в условиях удаления *Boc*-, *Fmoc*- и других защитных групп.

Используя *Tsotm*-группу, авторы успешно синтезировали *Met*-энкефалин [242].

3.2.2. Защитные группы, удаляемые кислотами

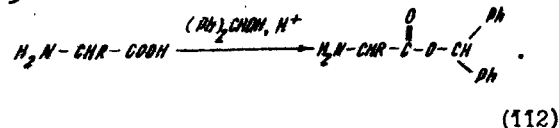
Как известно, метиловые, этиловые, бензиловые и другие сложные эфиры расщепляются при действии сильных кислот. Однако жесткие условия реакции не позволяют использовать этот способ деблокирования в практике пептидного синтеза. Первой C-защитной кислотолабильной группой, которая нашла весьма широкое применение в синтезе пептидов, является трет-бутильная группа, предложенная Реше в 1963 г. [231]. трет-Бутиловые эфиры устойчивы в щелочной среде и при гидрогенолизе, но чрезвычайно лабильны в трифторуксусной кислоте и в других сильных кислотах. Легкость кислотного расщепления этих эфиров можно объяснить образованием стабильного трет-бутильного катиона:



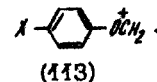
трет-Бутиловые эфиры устойчивы в условиях отщепления тритильной, *Broc*-, *Adroc*-групп; их можно расщеплять в присутствии большинства защитных групп. При удалении таких групп, как *Boc*-, *Asoc*-, *Adroc*-, трет-бутильная сложноэфирная группировка также отщепляется.

Устойчивые катионы образуются и при расщеплении сложных эфиров

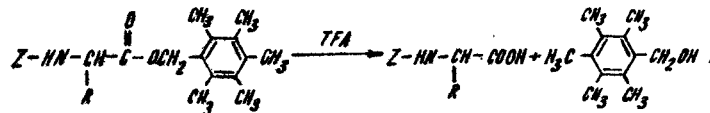
аминокислот со вторичными спиртами. Это обстоятельство позволило синтезировать бензгидриловые эфиры (112), лабильные в кислой среде [236]:



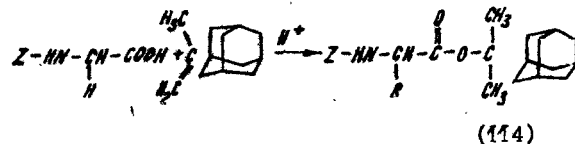
При введении в пара-положение метоксилиной электронодонорной группы устойчивость карбокатиона типа (113) увеличивается:



Это облегчает ацидолиз *p*-метоксибензиловых эфиров по сравнению с бензиловыми. Указанная группа была описана Вейтандом и Хангером в 1962 г. и применялась для синтеза пептидов [232]. Еще более кислотолабильную группу - пентаметилбензиловую - предложил Стюарт в 1968 г. [243]. Она удаляется трифторуксусной кислотой при 20 °C в течение 2 мин:



Недавно Ф.К. Мутулис с соавт. исследовали весьма лабильную 2-(адамантил)-пропан-2-иловую защитную группу (114), которую получали по схеме [241]

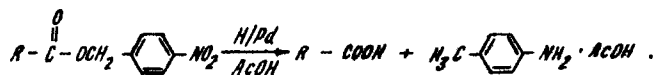


Эта группа удаляется в условиях, аналогичных отщеплению *Adroc*-защиты, т.е. может деблокироваться в присутствии *Boc*-группы и трет-бутиловых эфиров.

3.2.3. Защитные группы, удаляемые восстановлением

Каталитическое гидрирование. Возможность удаления бензильных и *p*-нитробензильных защитных групп гидрированием над палладиевым ка-

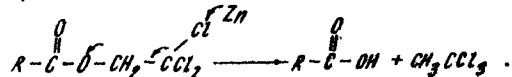
тализатором способствовала их широкому применению для синтеза пептидов. Одним из продуктов гидрогенолиза *p*-нитробензиловых эфиров является ацетат *p*-толуидина (115), от него можно легко освободиться в вакууме:



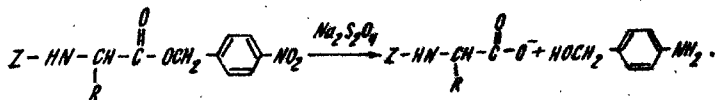
Поскольку при каталитическом гидрировании отщепляются многие другие *S*-защитные группы (см. табл. 1), данный способ деблокирования *S*-концевой группы пептидов удобен для одновременного удаления всех защитных групп на последней стадии синтеза.

Кроме газообразного водорода для каталитического гидрогенолиза применяются различные реагенты - доноры водорода: циклогексен, циклогексанин, муравьиная кислота, формиат аммония и другие соединения.

Восстановление цинком в уксусной кислоте. Ряд защитных групп удаётся "сняты" действием цинка в уксусной кислоте. К таким соединениям относятся 4-пиколиновые эфиры, 2-трихлорэтиловые эфиры, фенациловые эфиры. Предполагается, что атом цинка вытупает как источник электронов, вызывая согласованное аллиминирование блокирующих групп:



Восстановительное расщепление *p*-нитробензиловых эфиров. Этот интересный способ селективного удаления *p*-нитробензиловой группы был предложен в 1982 г. [253]. При действии избытка дитионата натрия на *p*-нитробензиловые эфиры аминокислот идет их избирательное расщепление:

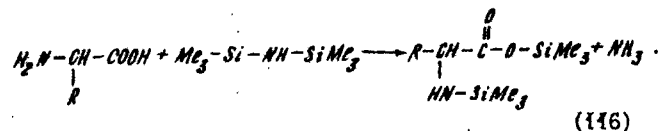


В этих условиях стабильны карбобензоксигруппа, *Boc*-группа, бензильная, нитрогруппа, блокирующая гуанидиновую функцию аргинина, метиловые и этиловые эфиры пептидов. Метод может оказаться полезным, так как он является практически единственным способом удаления *p*-нитробензиловой группы в присутствии бензильной защиты.

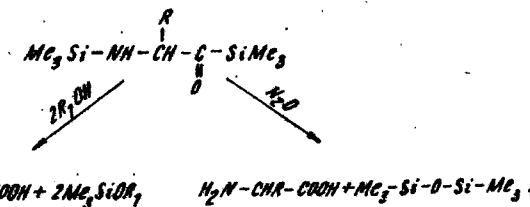
3.2.4. Другие способы удаления защитных групп

Кроме рассмотренных общих способов удаления *S*-защитных групп су-

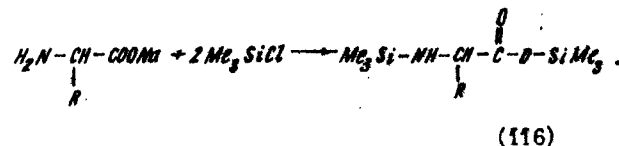
ществует ряд специальных методов отщепления редко используемых защитных группировок. Среди мало применяющихся, но широко известных групп, блокирующих *S*-конец пептидов, следует прежде всего назвать триметилсилильную группу, предложенную Биркофером и Риттером в 1960 г. [237]. Эти авторы показали, что при действии гекоаметиолазана на аминокислоты образуются *O*, *N*-триметилсилиламино кислоты (116):



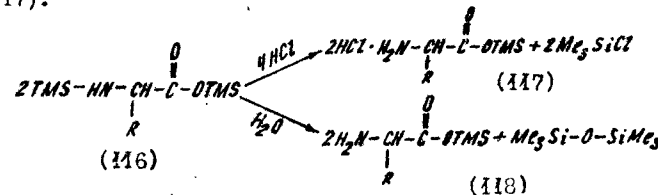
Триметилсилильная группа легко гидролизует под воздействием воды и спиртов:



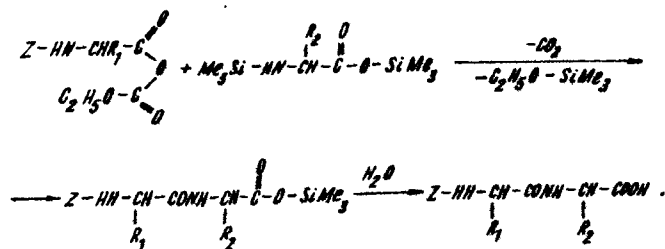
Крайняя лабильность *TMS*-группы чрезвычайно затрудняет работу с ней. *O*, *N*-*TMS*-аминокислоты (116) получают действием триметилхлорсилана на натриевые соли аминокислот [254]:



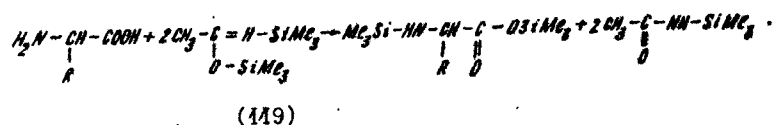
Как оказалось, благодаря достаточно высокой прочности связи *Si-O* можно избирательно отщеплять *N*-защитную группу и получать *O*-*TMS*-эфиры аминокислот в свободном виде (118) или в виде их хлоргидратов (117):



Позднее Биркофер с соавт. [255] показал, что *TMS*-группа не препятствует атаке аминогруппы ацилирующими агентами. Это обстоятельство авторы использовали для синтеза дипептидов методом смешанных ангидридов:

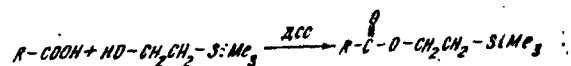


Применение *O, N-TMS*-аминокислот в качестве аминокомпонентов очень удобно, поскольку в отличие от аминокислот указанные производные хорошо растворимы в растворителях, применяемых для синтеза пептидов, а *C*-защитная *TMS*-группа легко удаляется при промывании продукта реакции растворами кислот. Е.П.Крысин с соавт. [256] показал, что при этом вместо смешанных ангидридов могут использоваться *N*-оксисульфонимидные эфиры. В этом случае бис(*O, N*-триметилсилил)-аминокислоты получают в результате действия бис(*O, N*-триметилсилил)ацетамида (119) на суспензию аминокислот в сухом хлористом метиле:

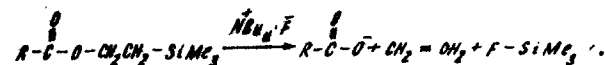


При этом отпадает необходимость очищать триметилсилилированные аминокислоты перегонкой в вакууме. В сборе С.М.Андреева с соавт. [257] подробно рассмотрено использование *TMS*-группы в пептидном синтезе.

Перспективной является 2-триметилсилилэтильная группа, введенная в практику пептидного синтеза Зибером с соавт. в 1977 г. [238]. Соответствующие эфиры получают по схеме

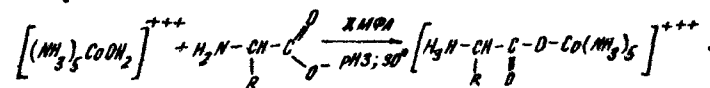


TMS-группа удаляется тетраметил- или тетрабутиламмонийфторидом в диметилформамиде при 20 °C в течение 10–60 мин:

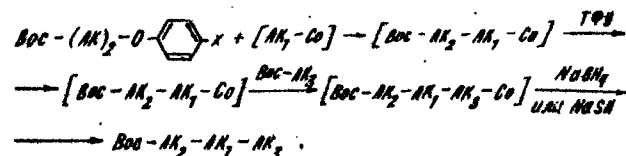


Она также медленно расщепляется хлористым водородом в органических растворителях и едким натром при деблокировании метиловых эфиров.

В 1982 г. Изайд с соавт. [247] предложил оригинальную нековалентную *C*-защитную группу. Блокирование карбоксильной группы достигается здесь за счет комплексообразования с пентааминокобальтом, который получают по схеме

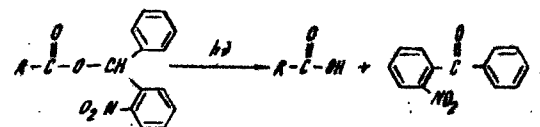


Ступенчатый синтез пептидов осуществляли по схеме



Новая защитная группа устойчива в условиях удаления *Boc*-группы и отщепляется действием боргидрида натрия или гидросульфидом натрия.

Из других экзотических способов защиты и последующего удаления *C*-защитных групп следует отметить фотолabileную *o*-нитробензгидрильную группу, которая отщепляется при освещении УФ-светом в бензоле или в четыреххлористом углероде [245]:



3.3. МЕТОДЫ ЭТЕРИФИКАЦИИ

Метиловые и этиловые эфиры аминокислот

Методика 147. Этерификация аминокислот в присутствии хлористого водорода [227]

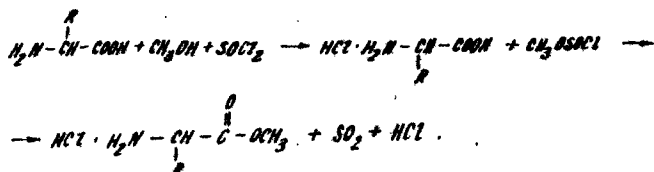
В суспензию 10 г аминокислоты в 150 мл абсолютного спирта, на-

ходящуюся в колбе, снабженной обратным холодильником с хлоркальциевой трубкой, пропускают без внешнего охлаждения ток сухого хлористого водорода. Реакционная смесь при этом разогревается; когда вся аминокислота растворится, колбу помещают в баню со льдом и при температуре 0–5 °С продолжают пропускать хлористый водород до насыщения. Реакционную смесь выдерживают 3–4 ч при комнатной температуре. Если выпадает осадок, то колбу оставляют на ночь в холодильнике, затем осадок отфильтровывают, промывают холодным спиртом, эфиром и сушат в вакуум-экзикаторе над едким кали.

Если продукт растворим и никакого осадка не образуется, то опирт удаляют на ротормом испарителе, а остаток растирают с эфиром, аморфный продукт отфильтровывают и выдерживают в вакуум-экзикаторе над едким кали.

Хлоргидраты эфиров аминокислот обычно хорошо кристаллизуются из смеси соответствующего спирта и эфира. При этерификации глутаминовой и аспарагиновой кислот, а также при получении сложных эфиров лизина пропускание хлористого водорода ведут при кипячении спиртового раствора аминокислоты в течение 1–3 ч и последующем выдерживании смеси в течение 2 ч при комнатной температуре.

Методика 148. Этерификация аминокислот действием хлористого тионилла в спирте [228]



В коническую колбу, снабженную магнитной мешалкой и пробкой с хлоркальциевой трубкой, помещают 30 мл абсолютного спирта и охлаждают его до –20 °С смесью сухого льда и ацетона; затем по каплям добавляют 1,45 мл (20 ммоль) перегнанного тионилхлорида и вносят 10 ммоль аминокислоты. Суспензию перемешивают 2 ч при –5 °С, температуру реакционной массы медленно поднимают до 40 °С и смесь выдерживают при этой температуре еще 2 ч. По мере этерификации аминокислоты осадок растворяется. Растворитель удаляют на ротормом испарителе; эту операцию повторяют дважды, каждый раз добавляя 30 мл спирта, наконец, остаток растирают с сухим эфиром. Этот способ получения эфиров аминокислот очень удобен и непродолжителен. Он особенно пригоден для этерификации тех аминокислот, которые неустойчивы в кислой среде, например триптофана и метрониона.

Методика 149. Хлоргидрат метилового эфира триптофана [258]

К 300 мл абсолютного метанола, охлажденного до –10 °С, прибавляют по каплям 22 мл (31 ммоль) свежеперегнанного тионилхлорида и при размешивании быстро вносят 30 г (14,7 ммоль) L-триптофана. Аминокислота при непрерывном размешивании в течение 2 ч при –10 °С постепенно растворяется. Затем смесь выдерживают 48 ч при комнатной температуре и выливают при размешивании в 1 л сухого эфира. Хлоргидрат метилового эфира триптофана медленно кристаллизуется. Продукт отфильтровывают, промывают эфиром. Выход 35,1 г (94 %), т.пл. 216 °С. Свойства хлоргидратов приведены в табл. 35.

Таблица 35. Свойства хлоргидратов метиловых эфиров аминокислот

Аминокислота	Т.пл., °С	$[\alpha]_D^{25}$, градус
L-Аланин	110–111	+5,8 (с=3, метанол)
L-Аргинин, 2HCl	196	+21,7 (с=2,5, MeOH)
О-Нитро-L-аргинин	159–161	+17,5 (с=3, метанол)
L-Аспарагин	116–117	–
L-Диметиловый эфир L-аспарагиновой кислоты	191–193	+21,4 (с=1, этанол – вода, 1:3)
L-Валин	175	+16,0 (с=2, вода)
L-Глутамин	145–147	–
L-Гистидин, 2HCl	199–202	+10,2 (с=2, вода)
N ¹ -Бензил-L-гистидин, 2HCl	111–115	–
L-Метиловый эфир L-глутаминовой кислоты	167	–
Глицин	175	–
L-Изолейцин	100–101	+26,6 (с=2, вода)
L-Лейцин	150–151	–13,4 (с=5, вода)
L-Лизин, 2HCl	212	–
N _E -Карбобензоксис-L-лизин	117	+16,7 (с=2, вода)
N _E -Вос-L-лизин	158–159	+19,0 (с=1, метанол)
L-Метионин	150	+26,8 (с=5, вода)
L-Оксипролин	162–164	–
	(с разложением)	–
L-Пролин	71	–34,0 (с=1, вода)
L-Серин	165–166	+0,9 (с=6, вода)
О-Бензил-L-серин	169	–2,7 (с=3, вода)
L-Тирозин	190	+74,3 (с=3, пиридин)
О-Бензил-L-тирозин	181	+11,5 (с=4, метанол)
L-Треонин (основание)	63–65	–21,0 (с=1,1, н. HCl)
L-Триптофан	216	+17,7 (с=2, метанол)
L-Фенилаланин	71	–1,6 (с=5, вода)
L-Цистеин	140	–2,9 (с=10, MeOH)
S-Бензил-L-цистеин	150	–13,9 (с=2,9, вода)

Омыление метиловых и этиловых эфиров пептидов

Метиловые и этиловые эфиры пептидов обычно омыляют водным раствором едкого натра в смеси с органическими растворителями: метанолом, этиловым спиртом, диоксаном или ацетоном. Процесс ведут при комнатной температуре в течение 1-2 ч; иногда время реакции может достигать 20 ч. Расщепление сложных эфиров аминокислот и пептидов в кислой среде, например соляной кислотой в ацетоне, в течение 1 ч применяется редко.

Методика 150. трет-Бутилоксикарбонилфенилаланил-серил-триптофанил-глицин [259]

К раствору 3,13 г (5 ммоль) этилового эфира трет-бутилоксикарбонилфенилаланил-серил-триптофанил-глицина в 30 мл метанола прибавляют 3 мл 2 н. раствора едкого натра (1,2 эквивалента) и перемешивают при комнатной температуре в течение 1,5 ч. Затем растворитель упаривают при пониженном давлении, а остаток разбавляют охлажденной водой, подкисляют лимонной кислотой до pH 3,0 и продукт экстрагируют этилацетатом. Органическую фазу промывают водой, сушат сульфатом магния, этилацетат упаривают досуха в вакууме. Остаток растворяют в этилацетате, и продукт осаждают петролейным эфиром. Выход аморфного пептида 2,8 г (98 %), т.пл. 125-130 °C, $[\alpha]_D^{25} = +39,2^\circ$ (с=1, ДМФА).

Ниже представлено описание этерификации аминокислот в мягких условиях. Преимуществом указанной методики является то, что при этом не наблюдается разрушения триптофана и других кислотолабильных остатков аминокислот [248].

Методика 151. п-Толуолсульфонат этилового эфира триптофана [248]

К раствору 2 г (10 ммоль) L-триптофана и 1,7 г (10 ммоль) п-толуолсульфокислоты в 20 мл спирта добавляют при комнатной температуре 2,3 г (12 ммоль) п-толуолсульфохлорида; смесь затем нагревают до кипения и кипятят 1,5 ч. После этого растворитель удаляют в вакууме, а остаток растирают с эфиром и продукт кристаллизуют из смеси этанол - эфир. Выход 3,6 г (90 %), т.пл. 143 °C, $[\alpha]_D^{25} = +16,6^\circ$ (с=2, этиловый спирт).

Методика 152. Хлоридрат бензильного эфира L-триптофана [248]

Триптофан (10 ммоль), п-толуолсульфокислоту (10 ммоль) и п-толуолсульфохлорид (12 ммоль) добавляют к 20 мл бензильного спирта и

смесь нагревают в течение 1,5 ч при 80 °C. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры, содержимое разбавляют 200 мл хлороформа и промывают 1 н. раствором бикарбоната натрия. Хлороформ упаривают в вакууме до объема около 100 мл, добавляют 2 мл 7,5 н. HCl в диоксане. Выпавший бесцветный осадок отфильтровывают из смеси метанол - эфир. Выход 2,8 г (85 %), т.пл. 215 °C, $[\alpha]_D^{25} = +5,4^\circ$ (с=2, метанол).

Свойства хлоридратов этиловых эфиров аминокислот представлены в табл. 36.

Т а б л и ц а 36. Свойства хлоридратов этиловых эфиров аминокислот

Аминокислота	Т.пл., °C	$[\alpha]_D^{25}$, градус
L-Аланин	77-78	+8,1 (с=1, вода)
α,β -Диметиловый эфир	109-110	+8,1 (с=1, вода)
L-аспарагиновой кислоты		
β -Этиловый эфир L-аспарагиновой кислоты	199-200	
L-Валин	102-104	+6,7 (с=2, вода)
Глицин	144	-
α -Этиловый эфир L-глутаминовой кислоты (основание)	134-135	
α,β -Диэтиловый эфир L-глутаминовой кислоты (основание)	116-118	
L-Лейцин	134	+18,4 (с=5, этиловый спирт)
L-Лизин	143,5-144,5	+11,7 (с=2,5, этанол)
β -Карбобензоксиг- L-лизин	115,5-116,5	+12,2 (с=2, 0,1 н. HCl)
L-Метионин	81-82	+18,7 (с=2,2, этанол)
L-Оксипролин	147-148	
L-Серин	130-131	-4,8 (с=2, вода)
L-Тирозин	166	
L-Триптофан	225-226	
L-Фенилаланин	154-155	-7,6 (с=3, вода)
L-Цистеин	115	
β -Бензил- L-цистеин	165-166	-4,2 (с=5, метанол)

Бензильные эфиры аминокислот

Методика 153. п-Толуолсульфонат бензильного эфира глицина [181]

В круглодонную колбу вместимостью 500 мл, снабженную насадкой Дина - Старка и обратным холодильником, помещают 18,8 г (0,25 ммоль) глицина, 48,5 г (0,255 ммоль) п-толуолсульфокислоты, 100 мл бензильного спирта и 50 мл бензола. Смесь нагревают и кипятят, осуществляя азеотропную отгонку воды. Когда соберется около 9 мл воды, реакционную смесь охлаждают и добавляют к ней 0,5 л эфира, выдерживают 2 ч

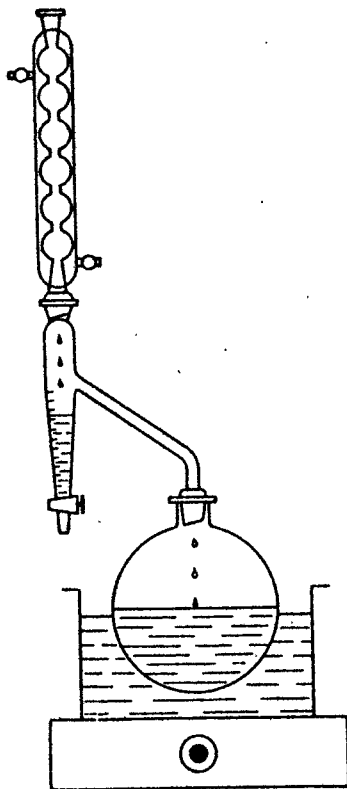


Рис. 5. Схема прибора для синтеза бензиловых эфиров аминокислот

при 0 °C и осадок п-толуолсульфоната бензилового эфира глицина отфильтровывают, промывают эфиром и кристаллизуют из смеси метанол - эфир. Выход 50 г (90 %), т.пл. 132-134 °C.

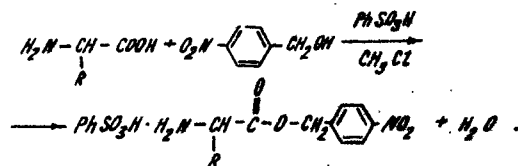
В табл. 37 представлены свойства п-толуолсульфонатов бензиловых эфиров аминокислот.

Получение β -бензилового эфира аспарагиновой кислоты и γ -бензилового эфира глутаминовой кислоты описано в гл. 4.

В синтезе пептидов большое распространение получили п-нитробензиловые эфиры аминокислот, которые имеют ряд преимуществ перед соответствующими бензиловыми эфирами: они устойчивы при обработке бромистым водородом в ледяной уксусной кислоте, хорошо кристаллизуются. Для расщепления их используют гидролиз или щелочное омыление.

п-Нитробензиловые эфиры
аминокислот

Методика 154. п-Нитробензиловые эфиры
аминокислот [260]



Суспензию 1,65 г (0,01 моль) L-Фенилаланина, 2 г (0,011 моль) бензолсульфокислоты и 2,1 г (0,014 моль) п-нитробензилового спирта в 130 мл сухого хлороформа кипятят с обратным холодильником в течение

Таблица 37. Свойства п-толуолсульфонатов бензиловых эфиров аминокислот

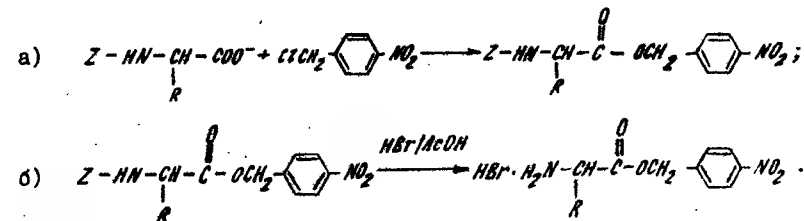
Аминокислота	Т.пл., °C	$[\alpha]_D^{25}$, градус
L-Аланин	116-118	-66,0 (с=4, метанол)
ψ -Нитро-L-аргинин	158-160	+1,0 (с=1, метанол)
α,β -Дибензиловый эфир L-аспарагиновой кислоты	158-160	+1,2 (с=2, метанол)
L-Валин	132-134	-
Глицин	144-145	+7,6 (с=2, метанол)
α,γ -Бензиловый эфир L-глутаминовой кислоты	153-154	-0,1 (с=2, метанол)
L-Изолейцин	158,5-160	-1,7 (с=2, метанол)
L-Лейцин	147-149	-2,8 (с=2, вода)
L-Лизин (дитозилат)	107-109	-21,8 (с=2, вода)
L-Оксипролин	179-180,5	-12,2 (с=2, метанол)
L-Тирозин	170,5-171,5	-7,2 (с=2, метанол)
L-Фенилаланин	162-163	-20,9 (с=1, метанол)
β -Бензил-L-цистеин		

15-20 ч. Конденсирующуюся жидкость перед возвращением в реакционную колбу пропускают через колонку с силикагелем или безводным сульфатом кальция.

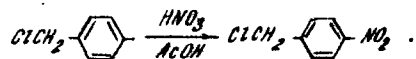
Спустя указанное время растворитель декантируют и остаток растворяют в 95 %-ном ацетоне. При медленном добавлении к полученному раствору безводного эфира выпадают кристаллы, которые очищают кристаллизацией из горячей воды после обработки активным углем. Продукт отфильтровывают и сушат в экзикаторе над P_2O_5 . Выход 2,93 г (65 %), т.пл. 190-191 °C, $[\alpha]_D^{25} = +11,0$ (с=4, ДМСА).

Время этерификации различных аминокислот обычно составляет от 1 ч до 2 дней. Выходы п-нитробензиловых эфиров составляют 60-90 %.

Бромгидраты п-нитробензиловых эфиров аминокислот получают в два этапа: синтезируют п-нитробензиловые эфиры карбобензоксиминокислот, которые затем обрабатывают бромистым водородом в уксусной кислоте:



Методика 155. п-Нитробензилхлорид [261]



В трехгорлую колбу, снабженную мешалкой, термометром и капельной воронкой, помещают 617 мл (14,8 моль) концентрированной азотной кислоты ($d = 1,51$). Колбу охлаждают смесью сухого льда и ацетона до -15°C и при перемешивании добавляют по каплям 160 мл (2,8 моль) ледяной уксусной кислоты, поддерживая температуру -15°C . К полученной нитрующей смеси прибавляют при -15°C 46 мл (0,4 моль) бензилхлорида, размешивают при -15°C в течение 30 мин и затем смесь выливают на 1,5 кг размельченного льда с такой скоростью, чтобы температура не превышала 0°C . Выпавший желтоватый осадок отделяют фильтрованием, промывают 100 мл ледяной воды, кристаллизуют из спирта. Получают 61,7 г (90 %) п-нитробензилхлорида в виде бесцветного кристаллического соединения с т.пл. $72,6^\circ\text{C}$.

Методика 156. Синтез п-нитробензиловых эфиров карбобензоксиаминокислот [262]

Смесь 20 ммоль карбобензоксиаминокислоты, 30 ммоль п-нитробензилхлорида (или бромида) и 30 ммоль триэтиламина в этилацетате кипятят с обратным холодильником в течение 12 ч. Полученный раствор охлаждают, фильтруют и затем последовательно промывают водой, 1 н. соляной кислотой, раствором хлористого натрия и сушат сульфатом магния. Этилацетат упаривают под уменьшенным давлением и остаток кристаллизуют из смеси этилацетат - гексан.

Если карбобензоксиаминокислота не растворима в этилацетате, то в качестве растворителя применяют диметилформамид.

Методика 157. п-Нитробензиловый эфир карбобензоксип-нитро-4-аргинина [263]

Смесь 15,5 г (44 ммоль) карбобензоксиаргинина, 9,3 г (71 ммоль) триэтиламина, 14,3 г (71 ммоль) п-нитробензилбромида (или соответствующее количество п-нитробензилхлорида) и 0,5 г чистого натрия в 70 мл сухого ацетона кипятят в течение 7 ч в колбе с обратным холодильником. Соли отфильтровывают, ацетон удаляют на ротаторном испарителе, остаток растворяют в 80 мл этилацетата и 20 мл воды и последовательно промывают 1 н. соляной кислотой, водой, 1 н. бикарбонатом натрия, снова водой, сушат сульфатом магния и наконец раствори-

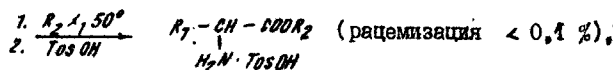
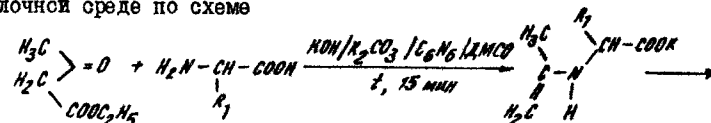
тель отгоняют в вакууме. Остаток растворяют в минимальном количестве этилацетата и выдерживают в течение ночи в холодильнике. Выпавшие кристаллы отфильтровывают, промывают холодным этилацетатом и сушат на воздухе. Выход 15 г (70 %), т.пл. 118°C , $[\alpha]_D^{25} = -9,0^\circ$ ($c=1$, ДМФА).

В табл. 38 даны физико-химические характеристики п-нитробензиловых эфиров аминокислот.

Таблица 38. Свойства бензолсульфатов п-нитробензиловых эфиров аминокислот

Аминокислота	Т.пл., $^\circ\text{C}$	$[\alpha]_D^{25}$, градус
L-Аланин	158-160	+7,1 ($c=7,5$, пиридин)
L-Аспарагиновая кислота (ди-п-Нитробензиловый эфир)	162-163	-8,4 ($c=1$, пиридин)
L-Валин	155	+15,1 ($c=1$, пиридин)
Глицин	191-192	
L-Гистидин	92-95	-4,95 ($c=3$, пиридин)
L-Лейцин	213-215	+16,7 ($c=1$, пиридин)
α -Тозил- L-лизин	170-172	+3,2 ($c=4$, ДМФА)
L-Серин	157-158	-14,4 ($c=1$, пиридин)
L-Тирозин	218-219	+15,2 ($c=1$, пиридин)
L-Фенилаланин	190-191	+11,0 ($c=4$, ДМФА)
3-Бензил- L-цистеин	170-171	-20,5 ($c=1$, ДМФА)

Недавно Котодейчик с соавт. [264] предложил новый быстрый метод синтеза метиловых, этиловых, бензиловых и п-нитробензиловых аминокислот действием на аминокислоты ацетоацетата и алкилирующих агентов в щелочной среде по схеме



где $\text{R}^2 = -\text{CH}_3$, $-\text{C}_2\text{H}_5$, $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$, $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$; $\text{X} = \text{Cl, Br}$; $\text{O}-\text{SO}_2-\text{R}^2$.

Методика 158. Общий метод получения эфиров аминокислот [264]

Смесь 10 ммоль аминокислоты, 0,6 г КОН, 0,3 г K_2CO_3 , 6 мл ДМСО, 8 мл бензола и 1,5 мл ацетоуксусного эфира кипятят 15 мин, используя насадку Дина - Старка для азеотропной отгонки воды, заполненную бензолом. Затем добавляют 16 ммоль алкилирующего агента, смесь переме-

Т а б л и ц а 39. Выход эфиров аминокислот, полученных по методике 158 [264]

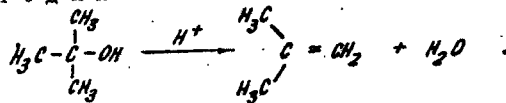
Аминокислота	Алкилирующий агент	Продукт реакции	Выход, %
L-Phe	(H ₃ CO) ₂ SO ₂	TosOH · L = Phe-OCN ₃ ^a	86
L-Leu	(H ₃ CO) ₂ SO ₂	TosOH · L = Leu-OCN ₃ ^a	85
		HBr · L = Leu-OCN ₃ ^b	67
		HCl · L = Leu-OCN ₃ ^c	78
		TFAOH · L = Leu-OCN ₃ ^d	75
L-Phe	(C ₂ H ₅ O) ₂ SO ₂	HCl · L = Phe-OC ₂ H ₅ ^e	81
L-Leu	C ₂ H ₅ -CN ₂ Cl	TosOH · L = Leu-OC ₂ H ₅ ^a	81
L-Leu	4-NO ₂ -C ₆ H ₄ -CH ₂ Br	TosOH · L = Leu-ONH ^a	89
L-Val	4-NO ₂ -C ₆ H ₄ -CH ₂ Br	TosOH · L = Val-ONH ^a	79

П р и м е ч а н и я: а) использовали 10 %-ный раствор п-толуолсульфокислоты в теплом этилацетате; б) использовали 48 %-ную бромистоводородную кислоту; в) использовали 5 %-ный раствор HCl в эфире; г) использовали трифторуксусную кислоту.

сшивают при 50 °C в течение 20 мин и разбавляют 20 мл этилацетата. Раствор промывают насыщенным раствором хлористого натрия (4x15 мл), сушат сульфатом магния и подкисляют 10 ммоль соответствующей кислоты. Тозилаты быстро кристаллизуются из раствора, хлоргидраты - медленнее. При получении других солей эфиров аминокислот раствор после подкисления концентрируют и остаток кристаллизуют из подходящего растворителя.

трет-Бутиловые эфиры аминокислот

М е т о д и к а 159. Синтез изобутилена [165]



Изобутилен можно легко получить путем дегидратации трет-бутилового спирта действием кислот (серной, павелевой, бензосульфокислоты) или в присутствии сульфокатионов. Небольшие количества изобутилена можно получить по следующим методам.

1. В колбе с обратным холодильником нагревают до кипения избыток трет-бутилового спирта с небольшим количеством серной кислоты. Изобутилен отводят через обратный холодильник в приемник, охлаждаемый смесью сухого льда и ацетона.

2. В двугорлый реакционный сосуд, снабженный обратным холодильником и капальной воронкой, помещают 50 г кристаллической павелевой кислоты, предварительно высушенной при 100-105 °C.

Реактор нагревают на водяной бане до 60 °C и затем по каплям прибавляют 100 г (127 мл) очищенного трет-бутилового спирта. Образующийся изобутилен отводят через обратный холодильник в конденсатор, охлаждаемый сухим льдом и ацетоном. Температуру бани постепенно повышают до 100 °C. Выход изобутилена 75 г (количественный).

Синтез трет-бутиловых эфиров аминокислот

В качестве реакционного сосуда для получения трет-бутиловых эфиров аминокислот удобно использовать бутылку из-под шампанского. После закрепления пробки проволокой бутылку оборачивают полотенцем, так как при достижении комнатной температуры внутреннее давление может разорвать ее.

После завершения реакции бутылку перед удалением пробки необходимо осторожно охладить на бане с сухим льдом и ацетоном.

М е т о д и к а 160. трет-Бутиловый эфир β-бензил-аспарагиновой кислоты [231]

К охлажденному раствору 3 г (13 ммоль) β-бензилового эфира аспарагиновой кислоты в смеси 25 мл диоксана и 2,5 мл концентрированной серной кислоты в бутылке из-под шампанского добавляют 25 мл жидкого изобутилена, бутылку закрывают и встряхивают при комнатной температуре в течение 4 ч. Затем содержимое охлаждают до -40 °C и быстро выливают в холодную смесь 200 мл эфира и 125 мл 1 н. едкого натра; эфирный слой отделяют, а водный экстрагируют эфиром. Эфирный раствор сушат сульфатом натрия, растворитель удаляют на роторном испарителе до объема 5 мл и прибавляют 25 мл эфира. При пропускании сухого хлористого водорода через полученный раствор образуется кристаллический осадок хлоргидрата трет-бутилового эфира (β-бензил)аспарагиновой кислоты. После кристаллизации из этилацетата выход продукта составляет 3 г (73 %), т.пл. 115-117 °C. Другие характеристики соединения приведены в табл. 39. Все трет-бутиловые эфиры, формулы которых указаны в этой таблице, синтезированы по описанной методике; исключение - трет-бутиловый эфир тирозина.

М е т о д и к а 161. трет-Бутиловый эфир L-тирозина [231]

В бутылке из-под шампанского или в реакторе растворяют 3 г L-тирозина в смеси 25 мл диоксана и 6 г п-толуолсульфокислоты или

Т а б л и ц а 40. Свойства хлоргидратов трет-бутиловых эфиров аминокислот

Аминокислота	Выход, %	Т.пл., °C	Т.кип. основ- ный, °C (дав- ление, Па)	$t_{\text{пл}}^{25}$, градус ($\sigma=1$, спирт)
β -Бензиловый эфир L -аспарагиновой кислоты	73	115-117	-	+23,3
α -Бензиловый эфир L -аспарагиновой кислоты	60	110-112	-	-2,6
L -Валин	65	147-149	63 (167)	+20,5
α -Бензиловый эфир L -глутаминовой кислоты	67	124-126	-	+13,8
γ -Бензиловый эфир L -глутаминовой кислоты	62	107-108	-	+16,4
Глицин		136	30 (267)	-
L -Изолейцин	60	158-160	52 (60)	+30,9
L -Лейцин	62	166-167	45 (20)	+12,4
N_ϵ -Тозил- L -лизин	72	136-138	-	+14,8
N_ϵ -Карбобензокси- L -лизин		147-149	-	+12,2
N_ϵ -Вос- L -лизин*		139-140	-	+12,2
L -Пролин	27	110-112	57 (200)	-30,5
О-трет-Бутил- L -серин**		170-170,5	70-71 (120)	-6**
L -Тирозин	45	143-145	-	+24
L -Фенилаланин	75	разлаг.	107 (33,3)	+44,2

* В метаноле.

** Получен по методике [266].

*** В диметилформамиде.

2,5 мл концентрированной серной кислоты, раствор охлаждают до -40°C , прибавляют 25 мл жидкого изобутилена, реактор закрывают и встряхивают 20 ч при комнатной температуре. Затем бутылку открывают после предварительного охлаждения и раствор выливают в холодную смесь 100 мл этилацетата, 100 мл воды и 5 мл 5 н. едкого натра, поддерживая pH 9,1. Продукт дважды экстрагируют этилацетатом, органическую фазу сушат сульфатом натрия и после удаления растворителя в вакууме получают кристаллический осадок. Выход 1,8 г (45 %), т.пл. 140-143 °C.

Хлоргидрат трет-бутилового эфира глицина по этому способу получить не удалось.

Следует отметить, что трет-бутиловые эфиры аминокислот в вакууме перегоняются без разложения.

В работе С.Павлова и соавт. [267] приведена несколько измененная методика синтеза трет-бутиловых эфиров аминокислот, которая позволяет получать эфиры с более высоким выходом.

М е т о д и к а 162. Синтез трет-бутиловых эфиров аминокислот [267]

К смеси 0,1 моль аминокислоты и 25 мл трет-бутилового спирта медленно прибавляют при размешивании и охлаждении до -20°C концентрированную серную кислоту (6 мл); реакционную смесь выдерживают 20 мин при этой температуре, после чего вводят 40 мл изобутилена, охлажденного до -20°C . Сосуд плотно закрывают и встряхивают 10-15 ч при комнатной температуре. Перед вскрытием сосуд охлаждают до -10°C , открывают и добавляют 60 мл 20 %-ного раствора едкого натра, охлажденного до 0°C . Полученный раствор насыщают поташем, и продукт экстрагируют эфиром (4х15 мл). Органический слой отделяют и сушат сульфатом магния, затем эфир отгоняют и оставшееся масло перегоняют в вакууме.

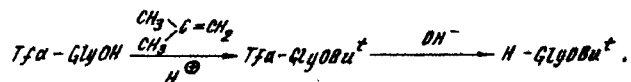
Этим способом получают свободные трет-бутиловые эфиры аминокислот. Для синтеза соответствующих хлоргидратов полученное соединение растворяют в сухом эфире (30 мл) и через образовавшийся раствор пропускают сухой хлористый водород. Хлоргидраты эфиров выпадают в осадок.

В табл. 41 приведены свойства продуктов, полученных указанным способом.

Т а б л и ц а 41. Свойства трет-бутиловых эфиров аминокислот

Аминокислота	Эфиры аминокислот		Хлоргидраты эфиров аминокислот	
	Выход, %	Т.кип., °C (давление, Па)	Выход, %	Т.пл., °C
L -Аланин	68	60 (1860)	78	142
L -Валин	60	63 (133,3)	65	147
Глицин	70	58 (2000)	75	139
L -Изолейцин	62	60 (13,3)	67	157
L -Лейцин	65	50 (400)	75	165
L -Пролин	35	58 (133,3)	30	110
L -Фенилаланин	68	115 (267)	80	185

В работе Андерсена и Каллахана [268] изложен двухстадийный метод синтеза трет-бутиловых эфиров аминокислот, заключающийся в обработке изобутиленом карбобензоксиаминокислоты и последующем деблорировании аминогруппы каталитическим гидрогенолизом над палладиевым катализатором. Ю.А.Давидович с соавт. [269] для синтеза трет-бутилового эфира глицина использовал в двухстадийном методе трифторацетилглицин.



трет-Бутиловый эфир трифторацетилглицина. В бутылку из-под шампанского помещают 140 г трифторацетилглицина в 200 мл диоксана и 10 мл концентрированной серной кислоты. Полученную смесь охлаждают до -30°C и прибавляют 400 мл жидкого изобутилена. Сосуд закрывают и встряхивают 12 ч при комнатной температуре до образования прозрачного раствора. Затем бутылку охлаждают, вскрывают, прибавляют 300 мл 1 н. едкого натра и продукт экстрагируют эфиром. Органическую фазу отделяют и сушат сульфатом магния, эфир упаривают в вакууме. Получают 162,9 г (90 %) продукта с т. кип. 86°C (400 Па).

трет-Бутиловый эфир глицина. К 25,5 г трет-бутилового эфира *N*-трифторацетилглицина прибавляют 600 мл 0,2 н. едкого натра и перемешивают массу 10 мин при комнатной температуре. Образовавшийся продукт экстрагируют эфиром, органический слой сушат сульфатом магния, эфир упаривают, а остаток перегоняют в вакууме. Выход 12,3 г (80 %), т. кип. 54°C (1,6 кПа).

Новый способ синтеза трет-бутиловых эфиров *N*-защищенных аминокислот предложил Дхаон с соавт. [250]. Он заключается в этерификации *N*-защищенных аминокислот трет-бутанолом по посредству водорастворимого карбодимида в присутствии катализатора - 4-диметиламинопиридина.

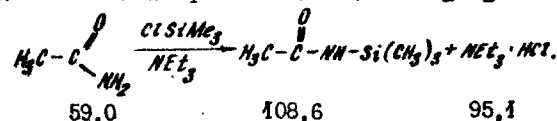
Методика 164. трет-Бутиловые эфиры
КБЗ-аминокислот [250]

Раствор 2,2 ммоль карбобензокояаминокислоты, 0,2-1,0 ммоль 4-диметиламинопиридина и 2,5 мл трет-бутилового спирта в 8 мл хлористого метилена охлаждают до 0°C и при перемешивании добавляют 2,4 ммоль хлоргидрата 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимида. Размешивание продолжают 2 ч при 0°C и затем (в течение ночи) при комнатной температуре. После удаления органического растворителя в вакууме остаток растворяют в 25 мл этилацетата и 5 мл воды. Органический слой отделяют и промывают насыщенным раствором бикарбоната натрия (2x15 мл), водой (2x15 мл) и сушат сульфатом натрия. Этилацетат удаляют на ротаторном испарителе, и продукт очищают на колонке с силикагелем-60 (230-400 меш) в смеси гексан - ацетон (9:1).

Выход эфира хороший: *Z-Ala-OBu*^t - 76 %, *Z-Val-OBu*^t - 79 %, *Z-Ile-OBu*^t - 78 % и *Z-Pro-OBu*^t - 88 %.

Триметилсилильные эфиры аминокислот

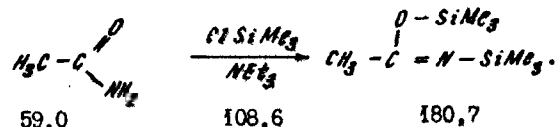
Методика 165. *N*-Триметилсилилацетамид [270]



К кипящей смеси 78 г (1,32 моль) сухого ацетамида, 108,6 г (1,08 моль) сухого триэтиламина и 400 мл бензола, высушенного над натрием, прибавляют при перемешивании в течение 1-1,5 ч 108,6 г (1,0 моль) триметилхлорсилана (через обратный холодильник), а затем еще нагревают с обратным холодильником в течение 1 ч. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры, фильтруют и промывают бензолом осадок солянокислого триэтиламина. Полученный коричневый фильтрат упаривают в вакууме (117,7 Па), перегоняют *N*-триметилсилилацетамид, который кипит при 84°C при 1,73 кПа. Выход продукта 113 г (90 %).

Внимание! Все описанные выше операции необходимо производить при полном исключении попадания влаги.

Методика 166. бис-(0, *N*-Триметилсилил)ацетамид [271]



К смеси 295 г (5 моль) ацетамида и 2,7 л триэтиламина в колбе вместимостью 12 л, снабженной мешалкой, обратным холодильником и капельной воронкой, добавляют при перемешивании 1460 г (1745 мл, 133 моль) триметилхлорсилана. Реакционную массу защищают от влаги воздуха с помощью трубки, наполненной дриоритом.

После прибавления всего триметилхлорсилана смесь слабо кипятят от 8 до 15 ч. При сильном кипячении происходит сублимация хлоргидрата триэтиламина, что ведет к забиванию холодильника. Реакционную массу охлаждают, фильтруют в токе сухого азота, осадок промывают на фильтре сухим триэтиламином (500 мл) и фильтрат концентрируют в

вакууме, нагревая жидкость не выше 100 °С. Остаток (темную жидкость) фракционируют о дефлегматором в вакууме. Выход основного продукта 813,6 г (80 %), т.кип. 71-73 °С (4,67 кПа).

Побочный продукт - (*N*-триметилсилил)ацетамид - кипит при 105-107 °С (4,67 кПа) и застывает при комнатной температуре в твердую массу.

М е т о д и к а 167. Синтез трет-бутилокарбонил-*L*-валил-глицина [256]

Смесь 0,4 г (5,3 ммоль) глицина, 3 г (14,8 ммоль) бис-(0,*N*-триметилсилил)ацетамида и 3 мл сухого хлористого метилена интенсивно размешивают в плотно закрытой колбе при комнатной температуре до полного растворения глицина. Одновременно проводят активацию карбоксильного компонента. Для этого к раствору 1,1 г (5 ммоль) Вос-*L*-валина и 0,8 мл триэтиламина в 5 мл сухого хлористого метилена, охлажденному до -15 °С, добавляют 0,6 г (5,5 ммоль) этилхлорформата и смесь размешивают при указанной температуре 15 мин.

К полученному омешанному ангидриду прибавляют раствор бис-(триметилсилил)глицина и реакционную массу размешивают при -15 °С 90 мин. Затем растворитель удаляют в вакууме, остаток растворяют в этилацетате, промывают водным раствором лимонной кислоты и потом водой. При этом карбоксильная группа дипептида полностью деблокируется. Органический растворитель сушат сульфатом магния, и этилацетат упаривают на ротаторном испарителе. Это дает 1,35 г (98 %) хроматографически чистого Вос-*L*-валил-глицина.

Синтез можно вести также в безводном диметилформамиде. Если для получения дипептида использовать *N*-оксисукцинимидный эфир Вос-*L*-валина, то реакцию ведут в течение 48 ч при комнатной температуре.

В процессе образования пептидной связи необходимо защищать реакционноспособные боковые группы некоторых аминокислот. К ним относятся: *ε*-аминогруппа лизина, *α*-аминогруппа орнитина, гуанидиновая группа аргинина, карбоксильные группы аспарагиновой и глутаминовой кислот, гидроксильные и тиольные группы серина, треонина, тирозина и цистеина, имидазольное кольцо гистидина. В некоторых случаях осуществляют блокирование боковых групп метионина, аспарагина и глутамина. Недавно предложены защитные группы для индольного кольца триптофана.

В зависимости от природы конденсирующих реагентов и тактики пептидного синтеза боковые группы указанных аминокислот иногда не блокируют, однако следует помнить, что защита реакционноспособных группировок аминокислот позволяет избежать побочных реакций и способствует растворимости пептидов в органических растворителях. Хорошим примером синтеза весьма крупного пептида с использованием тактики полной защиты является получение *L*-бунгаротоксина [272].

К боковым защитным группам предъявляют те же требования, что и для *N*- и C-защитных групп (см. гл. 2 и 3). Ту или иную защитную группу конкретной аминокислоты выбирают таким образом, чтобы обеспечить возможность селективного удаления других группировок. Весьма привлекателен такой способ синтеза пептидов, когда боковые защитные группы удаляются в конце синтеза одновременно с *N*- и C-защитными группировками. Например, защитные группы бензильного типа можно одновременно элиминировать каталитическим гидрогенолизом, если в составе получаемого пептида нет серосодержащих аминокислот. Сложные и прочные трет-бутильные эфиры аминокислот в сочетании с Вос-группой можно одновременно отщеплять обработкой *HCl* в диоксане или с помощью трифторуксусной кислоты.

Некоторые защитные группировки в процессе синтеза и отщепления могут давать нежелательные продукты. В последние годы эти побочные реакции тщательно исследуются (см., например, обзор [273]); продолжается также интенсивный поиск новых защитных групп, не дающих этих нежелательных процессов.

В табл. 42 приведены реагенты, используемые для защиты боковых групп трифункциональных аминокислот, и условия их отщепления.

Аминокислота	Замитная группа	Строение защитной группы	Формула защитной группы	Реагент для введения защитной группы	Способ удаления	Примечание	Литература
Аминокислотные кислоты							
Глутаминовая и аспарагиновая кислоты	Бензильные эфиры		$-OCH_2CH_2-$	$R-CH_2-C(=O)-NH_2$	$Ph-CH_2-OH, H^+$	Самая распространенная группа	[274]
	трет-Бутиловые эфиры		$-OCH_2CH_2-$	$R-CH_2-C(=O)-NH_2$	$CH_3-C(CH_3)_2-OH, H^+$	Применяется очень широко	[275]
	п-Нитробензильные эфиры		$-OCH_2CH_2-$	$R-CH_2-C(=O)-NH_2$	$Ph-CH_2-OH, H^+$	Применяется редко	[274]
	Циклогексил-овые эфиры		$-OCH_2CH_2-$	$R-CH_2-C(=O)-NH_2$	$Ph-CH_2-OH, H^+$	Более устойчивы, чем бензильные эфиры. Предложены для использования в твердофазном синтезе пептидов	[276]
	Циклогексил-овые эфиры		$-OCH_2CH_2-$	$R-CH_2-C(=O)-NH_2$	$Ph-CH_2-OH, H^+$	Предложены для использования в твердофазном синтезе пептидов	[277]
Диаминокарбоновые кислоты							
Лизин	Бензильная группа		$-CH_2CH_2-$	$R-NH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$	$Ph-CH_2-OH, H^+$	Самая распространенная группа	[278]

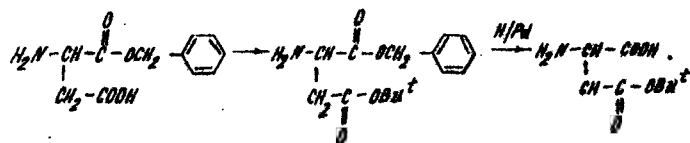
Аргинин	2,4-Дихлорбензилоксикарбонильная группа		$(Cl)_2C-$	$R-NH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$	$Ph-CH_2-OH, H^+$	Более устойчива к действию KOH , чем K_2CO_3 группа	[279]
	трет-Бутилоксикарбонильная группа		$-CH_2CH_2-$	$R-NH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$	$CH_3-C(CH_3)_2-OH, H^+$	Применяется очень широко	[279]
	Формильная группа		$(HCO-)$	$R-NH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$	$HCOOH, H_2O$	Используют в твердофазном методе синтеза пептидов	[280]
	Толуильная группа		Tos	$R-NH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$	$CH_3-C_6H_4-OH, H^+$	Удобна в твердофазном методе синтеза пептидов	[281]
	Трифтороацетильная группа		(CF_3CO-)	$R-NH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$	$CF_3-C(=O)-OH, H^+$	Самая распространенная группа	[282]
Аргинин	ω-Нитрогруппа		$-NO_2$	$R-NH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$	$NO_2-CH_2-CH_2-OH, H^+$	Используется весьма широко	[283]
	ω, ω'-Дибензилоксикарбонильная группа		$2-$	$R-NH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$	$Ph-CH_2-OH, H^+$	Часто применяют в твердофазном методе синтеза пептидов	[284]
	Толуильная группа		Tos	$R-NH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$	$CH_3-C_6H_4-OH, H^+$	Часто применяют в твердофазном методе синтеза пептидов	[284]

Аминокислота	Защитная группа	Символ защитной группы	Формула защитной группы	Реагент для введения защитной группы	Способ удаления	Примечание	Литература
п-Метоксибензолсульфонильная ω, ω' -бис-аланилгликоконнарионильная N^6 -Мезитилентрет-сульфонильная	п-Метоксибензолсульфонильная	MB3-		$CH_3O-C_6H_4-SO_2Cl, OH^-$ (TFA, HF)	CH_3SO_3H (TFA, HF)	Весьма перепек- тивная защит- ная группа Легко удаляется	[285] [286]
	ω, ω' -бис-аланилгликоконнарионильная	Adoc-		$Adoc-Cl, OH^-$	TFA		[287]
	N^6 -Мезитилентрет-сульфонильная	MTS-		CH_3SO_3H, CH_3SO_3H		Предложена не- давно. По-види- мому, перепек- тивная группа	[288]
	Бензильная	BZ1-		$Ph-CH_2-Cl, OH^-$	HF, TFA	Очень распро- странена	[289]
	трет-Бутилоксикарбонильная	Boc-		$Boc-N_3, Boc_2O$		Весьма перепек- тивная группа, удаляется в ко- нцентрированно мн- ких условиях	[290]
Трипсин	Тозильная	Tos-		$H_3C-C_6H_4-SO_2Cl, OH^-$	$HOBT, K_2CO_3, HF$	Удобна при твер- дофазном методе синтеза пепти- дов	[291]
2, 4-Динитро- фенильная	2, 4-Динитро- фенильная	Dnp-		$O_2N-C_6H_3(NO_2)-F$	$HF, R-SH$		[292]
	Фенацильная			$Ph-C-CH_2Br, NBr/TFA, N/Pd, Zn/MeOH, H^+$		Стабильна в щелочной среде. Устойчива к TFA, $NBr/MeOH$	[293]
Бензилоксикарбонильная	Бензилоксикарбонильная	Z-		$MeS-Cl, N/Pd, OH^-$		Устойчива к $NBr/MeOH$, за- бытна в щелоч- ной среде. Ис- пользуется редко	[294]
Тирозин	Бензильная	BZ1-		$Ph-CH_2-Br, OH^-$	$N/Pd, HF$	Самая распро- страненная за- щитная группа для тирозина	[295]
	2, 6-Дихлор- бензильная			$Cl-C_6H_3Cl_2-O-CH_2-C(=O)-NH-R$	HF	Более устойчи- ва в TFA, чем BZ1. Использо- уется в твердо- фазном методе синтеза пепти- дов	[296]
	Бензилокси- кароонильная	Z-Cbz-		$Cbz-Cl, OH^-$	$N/Pd, NBr/MeOH, DMF, HF$	Используется редко	[297]
трет-Бутилокси- кароонильная	трет-Бутилокси- кароонильная	Boc-		$Boc-N_3, Boc_2O$	OH^-, HF	-	[297]

Аминоислоты	Защитная группа	Связь защитной группы	Формула защитной группы	Реагент для введения защитной группы	Способ удаления	Примечание	Литературный источник
Серин, треонин	трет-Бутильная	OBu^t		$CH_3-C(CH_3)=CH_2, H^+$	TFA, H^+ , HF	Используется весьма широко	[299]
	о-Нитробензильная	ONB			Удаление OH^-	Новая защитная группа	[300]
	Диметилфосфинотолульная	$DMPT$		$CH_3-P(=O)(CH_3)-CH_2-CH_2-NO_2$	HF	Используется очень широко	[301]
	Бензильная	Bzl		$Ph-CH_2-Br, OH^-$	HF	То же	[302]
	трет-Бутильная	OBu^t		$CH_3-C(CH_3)=CH_2, H^+$	TFA, HCl, HF	Практически не используется	[303]
Цистеин	Бензильная	Bzl		$Ph-CH_2-Br, OH^-$	OH^-	Используется очень широко	[304]
	Ацетамидометильная	AcM		$CH_3-C(=O)-NH-CH_2-Br, OH^-$	HF	Используется весьма широко	[305]
	Бензамидометильная	BaM		$Ph-C(=O)-NH-CH_2-Br, OH^-$	HF	То же	[306]

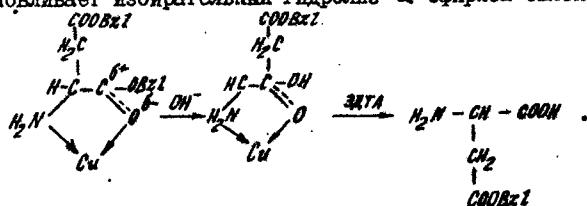
трет-Бутильная	Bu^t		$CH_3-C(CH_3)=CH_2, H^+$	HF, HCl, H^+	Группа устойчива в кислой среде	[307]
п-Метоксибензильная	$MBzl$		$CH_3-O-CH_2-CH_2-Br, OH^-$	HF	Используется редко	[308]
п-Нитробензильная	NB		$CH_3-O-CH_2-CH_2-Br, OH^-$	HF	Используется редко	[309]
Сульфокислотная	CH_3SO_2		$CH_3SO_2-CH_2-Br, OH^-$	HF	Используется редко	[310]
Глутамин, аспарагин	MBz		$CH_3-O-CH_2-CH_2-Br, OH^-$	HF	Используется редко	[311]
9-Ксантильная	MBz		$CH_3-O-CH_2-CH_2-Br, OH^-$	HF	Используется редко	[312]
п-Формильная	MBz		$CH_3-O-CH_2-CH_2-Br, OH^-$	HF	Используется редко	[313]
2,4,6-Триметоксибензолсульфонильная	MBz		$CH_3-O-CH_2-CH_2-Br, OH^-$	HF	Используется редко	[314]

Для защиты β - и γ -карбоксильных групп аспарагиновой и глутаминовой кислот их превращают в сложные эфиры. Чаще всего для этой цели используют бензиловые и трет-бутиловые эфиры. Трет-бутиловые эфиры получают по общей методике (см. гл. 3) из соответствующих α -бензиловых эфиров аспарагиновой или глутаминовой аминокислоты с последующим удалением бензильной группы каталитическим гидрированием по схеме



Если соответствующие аминокислоты являются С-концевыми, при синтезе пептида могут использоваться соответствующие α -бензиловые эфиры с трет-бутильной защитой боковых карбоксильных групп. Если же аспарагиновая или глутаминовая кислота локализована в N-концевой части пептида, их трет-бутиловые эфиры переводят сначала в N-карбобензильные-, N-Вос- или другие подобные производные, а затем используют в синтезе. Следует подчеркнуть, что на С-конце синтезируемых олигопептидов удобно использовать дибензиловые эфиры аспарагиновой и глутаминовой кислот, а на N-конце — соответствующие N-ацильные производные β - и γ -бензиловых эфиров (см. гл. 2).

Для синтеза бензиловых эфиров боковых карбоксильных групп также проводят избирательный гидролиз дибензиловых эфиров в виде их медных комплексов [315]. При образовании хелата карбоксильная группа поляризуется. Это увеличивает электрофильность атома углерода и обуславливает избирательный гидролиз α -эфирной связи:



При стеснении бензильных групп могут наблюдаться побочные процессы. Так, бензиловые эфиры аспарагиновой и глутаминовой кислот часто гидролизуются в условиях удаления карбобензоксигруппы бром-

ным водородом в кетоническую кислоту; кроме того, может иметь место транспептидация с образованием β - и γ -пептидных связей. Этот процесс идет, например, в присутствии бромистого или фтористого водорода.

Рассмотрим несколько прописей получения бензиловых эфиров аспарагиновой и глутаминовой кислот.

Методика 168. β -Бензиловый эфир L-глутаминовой кислоты [257]

К 100 мл сухого эфира прибавляют при перемешивании 10 мл концентрированной серной кислоты и 100 мл безводного бензилового спирта. Продолжая размешивание, добавляют небольшими порциями 15,1 г (0,1 моль) L-глутаминовой кислоты. Полученный раствор выдерживают 20 ч при комнатной температуре, после чего эфир удаляют на роторном испарителе, а к остатку добавляют 200 мл этилового спирта и 50 мл пиридина. Продукт реакции начинает тотчас же кристаллизоваться. Смесь выдерживают 10 ч при 0 °С, выпавшие кристаллы отфильтровывают, промывают эфиром и сушат. Для очистки продукта его растворяют в 190 мл кипящей воды, раствор фильтруют и оставляют на 6 ч при 0 °С. Образовавшиеся кристаллы отфильтровывают, промывают водой и сушат. Выход 18 г (76 %), бесцветные пластинки с т.пл. 189 °С, $[\alpha]_D^{25} = +19,6^\circ$ (с=5, уксусная кислота).

β -Бензиловый эфир L-аспарагиновой кислоты получают с выходом 40–45 % по аналогичной методике [316], т.пл. 218–220 °С, $[\alpha]_D^{25} = +28,1^\circ$ (с=1, 1 н. соляная кислота).

Методика 169. γ -Бензиловый эфир L-глутаминовой кислоты [315]

К раствору 10 г (20 ммоль) п-толуолсульфоната дибензилового эфира L-глутаминовой кислоты в 140 мл этилового спирта прибавляют раствор 20 г (80 ммоль) сульфата меди в 350 мл воды, pH раствора доводят, добавляя 1 М NaOH, до 8,0 и реакционную смесь выдерживают 1 ч при 32 °С, после чего pH раствора снижают 3 М соляной кислотой до 3,0. Образовавшийся медный комплекс γ -бензилового эфира глутаминовой кислоты отфильтровывают, последовательно промывают водой, спиртом и наконец эфиром. Полученный комплекс добавляют к раствору 7,8 г (21 ммоль) динатриевой соли этилендиаминетрауксусной кислоты (трилон "Б") в 100 мл воды, кипятят и горячим фильтруют. При стоянии и охлаждении раствора выпадает осадок γ -бензилового эфира глу-

таминной кислоты. Выход продукта 3,5 г (74 %), т.пл. 169–170 °С; $[\alpha]_D^{25} = +19,3^{\circ}$ ($c=5$, уксусная кислота).

β -Бензиловый эфир L -аспарагиновой кислоты синтезируют аналогично. Выход 67 %.

β - и γ -трет-Бутиловые эфиры соответственно аспарагиновой и глутаминовой кислот получают по методике [275]. β -трет-Бутиловый эфир L -аспарагиновой кислоты: т.пл. 189–190 °С, $[\alpha]_D^{25} = +8,5^{\circ}$ ($c=1$, 90 %-ная уксусная кислота); γ -трет-бутиловый эфир L -глутаминовой кислоты: т.пл. 168–169 °С, $[\alpha]_D^{25} = +8,15^{\circ}$ ($c=2$, вода).

4.2. ЗАЩИТА БОКОВЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП ДИАМИНОКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Для защиты ϵ -аминогруппы лизина чаще всего применяют карбобензоксигруппу или Вос-группу, значительно реже используют формильную и трифторацетильную группы. Для придания большей устойчивости защитной группе ϵ -аминогруппы лизина в твердофазном методе синтеза пептидов используют замещенную карбобензоксигруппу: например, такую, как 2-хлор- или 2,4-дихлоркарбобензоксигруппу [278]. Эти производные оказались более устойчивыми, чем незамещенная Кбз-группа, соответственно в 60 и 90 раз при удалении Вос-группы трифторуксусной кислотой.

Методика 170. M_{ϵ} -Карбобензоксигруппа- L -лизин [277]

Навеску 1,8 г (10 ммоль) монохлоргидрата лизина растворяют в 15 мл воды, добавляют избыток карбоната меди и смесь кипятят в течение 30 мин, затем фильтруют и добавляют 5 мл 2 н. раствора едкого натра. Реакционная смесь окрашивается в интенсивный голубой цвет. Раствор охлаждают и при перемешивании добавляют десять порциями в течение 30 мин 2 мл карбобензоксиклорида и 10 мл 2 н. едкого натра. В результате реакции выпадает медный комплекс ϵ -карбобензоксигруппы лизина. Его отфильтровывают, промывают водой, затем спиртом и суспендируют в 200 мл воды и в суспензию при размешивании пропускают ток сероводорода до полного разложения медного комплекса. Реакционную массу нагревают до кипения и фильтруют в горячем состоянии; при охлаждении кристаллизуется ϵ -карбобензоксигруппы лизин в виде длинных бесцветных игл; оставляют на ночь в холодильнике и отфильтровывают осадок. Дополнительное количество продукта можно получить после отгонки растворителя до малого объема и последующей кристаллизации. Общий

выход 2,3 г (80 %), кристаллизация из воды дает продукт с т. пл. 235 °С, $[\alpha]_D^{25} = +14,4^{\circ}$ ($c=1,6$, разбавленная соляная кислота).

Методика 171. M_{ϵ} -трет-Бутилокарбонил- L -лизин [279]

Раствор 10 г (55 ммоль) хлоргидрата L -лизина в 80 мл воды и 10 г основного карбоната меди нагревают 30 мин до кипения. Темно-голубой раствор отфильтровывают от избытка карбоната меди, охлаждают, смешивают с 3 г оксида магния. При энергичном перемешивании к охлажденному раствору прибавляют по каплям 11,5 г (80 ммоль) трет-бутилкарбонилхлорида в 150 мл метанола. Реакционную массу размешивают в течение ночи при 45 °С. При этом выпадает медный комплекс ϵ -Вос-лизина в виде светло-голубого осадка. Для удаления избытка оксида магния смесь осторожно подкисляют при размешивании и охлаждении 50 мл 2 н. уксусной кислоты. Размешивание продолжают в течение 2 ч при 2 °С, а затем комплекс отфильтровывают, промывают водой, метанолом и сушат. Выход 7,1 г (30 %), т.пл. 230–240 °С.

Медный комплекс (14 г) хорошо растирают в ступке и затем суспендируют в 300 мл воды. При охлаждении льдом добавляют 50 мл 2 н. раствора аммиака и при интенсивном размешивании пропускают в течение 3 ч сероводород. Для удаления избытка сероводорода колбу охлаждают льдом, добавляют 75 мл 2 н. уксусной кислоты и продувают через раствор ток воздуха до тех пор, пока не исчезнет запах сероводорода. После фильтрования раствора через угольные фильтры выпадают кристаллы ϵ -Вос- L -лизина, их отфильтровывают, промывают холодной водой и сушат. Выход 11 г (88 %), т.пл. 220–225 °С; $[\alpha]_D^{25} = +17,1^{\circ}$ ($c=1$, уксусная кислота).

Методика 172. M, M' -Дикарбобензоксигруппа- L -лизин [317]

К раствору 125 г (684 ммоль) хлоргидрата L -лизина в 342 мл воды и 684 мл 2 н. едкого натра, охлажденному до -10°C , добавляют при интенсивном размешивании в течение 75 мин 852 мл 4 н. едкого натра и 360 мл карбобензоксиклорида (предварительно охлажденных до 0°C) с такой скоростью, чтобы pH раствора был не ниже 10. Перемешивание продолжают еще 10 мин, а затем раствор при охлаждении подкисляют до pH 1,5 (1 л 2 н. соляной кислоты). Продукт дважды экстрагируют эфиром, органическую фазу промывают 1 н. соляной кислотой и водой, а затем обрабатывают 1 н. раствором аммиака сначала 2 л, а затем дважды по 0,5 л. Аммиачные растворы промывают эфиром и затем

подкисляют при 0 °С с помощью 700 мл 4 н. соляной кислоты в присутствии 500 г измельченного льда и 2 л эфира. Органический слой отделяют, а водную фазу экстрагируют 400 мл эфира. Эфирные вытяжки соединяют и экстрагируют 1 н. раствором аммиака (1 раз порцией 2 л и 2 раза по 400 мл). Раствор продукта в аммиаке дважды промывают эфиром и затем подкисляют при 0 °С и хорошо перемешивании 750 мл 4 н. HCl в присутствии 2 л эфира. Органический слой отделяют, водный раствор экстрагируют эфиром (2х200 мл). Эфирный слой сушат сульфатом магния, эфир удаляют на ротационном испарителе. Полученное масло (243 г) растворяют в толуоле, а затем растворитель удаляют на ротационном испарителе в вакууме; эту операцию повторяют дважды. Остаток после отгонки толуола кристаллизуют из смеси 350 мл эфира и 1000 мл петролейного эфира. После фильтрования, промывания петролейным эфиром и высушивания получают 223 г (79 %) дикарбобензоксиг- ϵ -лизина с т.пл. 88-90 °С, $[\alpha]_D^{25} = -5^{\circ}$ (с=2, метанол).

Поскольку в твердофазном методе синтеза пептидов используют многократную обработку пептидполимера трифторуксусной кислотой, то для устранения побочных реакций, связанных с частичным отщеплением ϵ -карбобензоксигруппы лизина, была предложена и нашла широкое применение в 90 раз более устойчивая к ацидолизу защитная 2,4-дихлорбензилоксикарбонильная группа. Ниже приведены прописи получения N_{ϵ} -(2,4-дихлорбензилоксикарбонил)-L-лизина [278].

Методика 173. 2,4-Дихлорбензиловый спирт [278]

52 г (0,272 моль) 2,4-дихлорбензойной кислоты (предварительно очищенной кристаллизацией из смеси хлороформ - бензол (1:1 по объему)) с т.пл. 160,2-161 °С растворяют в 250 мл сухого тетрагидрофурана; полученный раствор прибавляют в течение 20 мин при перемешивании в токе азота к раствору 9,5 г (0,25 моль; 1,2 эквивалента) аллюмогидрида лития в 750 мл сухого ТГФ. Смесь кипятят до тех пор, пока вся 2,4-дихлорбензойная кислота не прореагирует. Обычно на это требуется около 20 ч. Затем реакционную массу охлаждают и осторожно подкисляют 6 н. соляной кислотой и экстрагируют этилацетатом. Органическую фазу промывают водой, затем 0,1 М бикарбонатом натрия, сушат и растворитель удаляют на ротационном испарителе. Кристаллизацией из гексана дает 32,7 г (68 %) 2,4-дихлорбензилового спирта с т.пл. 57,2-58,4 °С.

Методика 174. N_{ϵ} -(2,4-Дихлорбензилоксикарбонил)-L-лизин [278]

35,4 г (0,2 моль) 2,4-дихлорбензилового спирта в 1,25 М растворе фосгена в бензоле выдерживают при температуре 20 °С в течение 37 ч в плотно закрытой оклянке, после чего растворитель удаляют на ротационном испарителе в вакууме водоструйного насоса, поместив перед ним ловушку, охлаждаемую сухим льдом с ацетоном. Следы фосгена удаляют двукратным добавлением и последующей отгонкой в вакууме сухого диоксиана (50 мл). Оставшуюся прозрачную жидкость (52 г) растворяют в 120 мл сухого диоксиана; этот раствор 2,4-дихлорбензилхлорформата используют в дальнейшем для ацилирования медного комплекса лизина.

К раствору хлоргидрата L-лизина (44,1 г, 0,24 моль) в 500 мл горячей воды добавляют небольшими порциями 30,9 г (0,13 моль) порошкообразного основного карбоната меди; реакционную смесь нагревают до кипения и затем фильтруют в колбу Бунзена вместимостью 2 л, а осадок на фильтре промывают 20 мл горячей воды. К полученному голубому раствору добавляют 120 мл 2 М раствора бикарбоната калия и 300 мл диоксиана и раствор охлаждают до 0 °С, погружая колбу в баню с ледяной водой. Продолжая охлаждение, в колбу вносят каждые 10 мин порцию раствора 2,4-дихлорбензилхлорформата (10 мл) и 4 М раствора КОН (4,2 мл). Добавление этих реактивов занимает примерно 2 ч, а затем реакционную массу размешивают в течение 10 ч при 0 °С. Образовавшийся осадок отделяют фильтрованием и тщательно промывают водой, этиловым спиртом и эфиром. Выход медного комплекса 65,1 г (85 %).

Полученный продукт добавляют в течение 30 мин небольшими порциями к суспензии ЭДТА (30 г, 0,1 моль) в 0,33 М соляной кислоте (1,2 л), смесь размешивают в течение 1,5 ч, а затем осадок отсасывают. Продукт суспендируют в 1 л смеси этиловый спирт - вода (7:3 по объему), кипятят в течение некоторого времени и затем фильтруют. При охлаждении раствора выпадают бесцветные призмы N_{ϵ} -(2,4-дихлорбензилоксикарбонил)-L-лизина (25,7 г). Упариванием маточника и последующим охлаждением можно получить дополнительно еще 27,6 г продукта. Общий выход 76 %.

трет-Бутилоксикарбонил- N_{ϵ} -(2,4-дихлорбензилоксикарбонил)-L-лизин в виде вязкого бесцветного масла получают с выходом 97 % общими методами (см. гл. 2).

Тейлор с соавт. [330] предложили использовать для разложения медных комплексов аминокислот тхоацетамид. Авторы показали, что при обработке медных комплексов N_{ϵ} -карбобензоксиг-L-орнитина и N_{ϵ} -карбобензоксиг-L-лизина тхоацетамидом в щелочной среде образуются соответствующие карбобензоксикаминокислоты с хорошим выходом, а сульфид меди легко удаляется.

Методика 175. *N*⁶-Карбобензоокси-*L*-орнитин [330]

5,4 г (9 ммоль) медного комплекса *N*⁶-карбобензоокси-*L*-орнитина суспендировали в 50 мл воды и добавляли к суспензии 1 г (13,3 ммоль) тиоацетамида. Далее добавляли 2 н. раствор *NaOH* до pH 8,0 и смесь перемешивали 26 ч при комнатной температуре. Подключали раствор 2 н. соляной кислотой до pH 1,6 и удаляли сульфид меди фильтрацией, осадок промывали на фильтре разбавленной соляной кислотой, а затем водой. Для осаждения *N*⁶-карбобензоокси-*L*-орнитина фильтрат подщелачивали до pH 8,0 2 н. *NaOH*, отделяли осадок фильтрованием, промывали его водой и продукт реакции очищали пересаживанием его раствора в соляную кислоту, добавляя раствор едкого натра. Выход 4,8 г (87,5 %), т.пл. 253 °C, $[\alpha]_D^{20} = +18^\circ$ ($c=1$, водный ацетон 1:1 + 2 экв. *HCl*).

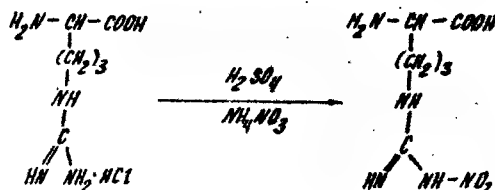
Методика 176. *N*⁶-Карбобензоокси-*L*-лизин [330]

500 мг (0,8 ммоль) медного комплекса *N*⁶-карбобензоокси-*L*-лизина обрабатывали по описанной выше методике. После кристаллизации из смеси этанол – вода выход *N*⁶-карбобензоокси-*L*-лизина составил 200 мг (88 %), т.пл. 255 °C, $[\alpha]_D^{20} = +15^\circ$ ($c=1,5$, 2 н. *HCl*).

4.3. ЗАЩИТА ГУАНИДИНОВОЙ ГРУППЫ АРГИНИНА

Несмотря на то, что в последнее время для синтеза аргининосодержащих пептидов широко используют аргинин со свободной гуанидиновой функцией, т.е. аргинин в протонированной форме, во многих случаях удобнее работать с блокированной гуанидиновой группой. Наиболее распространенными защитными группировками ее являются нитро-, дикарбобензоокси- и тозилная группы.

Нитрогруппу вводят при обработке аргинина смесью олеума и азотной кислоты [318], однако лучшие результаты получаются при нитровании аргинина нитратом аммония в серной кислоте [319].



Тозильную группу и родотвенную ей *p*-метоксибензолсульфонильную

вводят, используя соответствующие сульфохлориды, в условиях реакции Шоттена – Баумана.

Весьма удобным производным для введения *N*-концевого аргинина в пептиды является трикарбобензоксиаргинин, а также *N*-бензилокси-карбонил-*N,N'*-ди(адамантил-1-оксикарбонил)-аргинин. Ниже даны примеры синтезов этих производных аргинина.

Методика 177. *ω*-Нитро-*L*-аргинин [319]

К 200 мл концентрированной серной кислоты при комнатной температуре добавляют при перемешивании небольшими порциями 100 г (0,43 моль) хлоргидрата аргинина. Выделяющийся хлористый водород отсасывают водоструйным насосом до тех пор, пока не прекратится выделение пузырьков газа. К образовавшемуся прозрачному раствору медленно добавляют при перемешивании 50 г нитрата натрия и через 15 мин опять удаляют выделяющийся газ водоструйным насосом. После прекращения выделения пузырьков газа реакционную массу выливают при размешивании на мелко измалоченный лед. Полученный раствор фильтруют и доводят pH раствора до 6,8 водным аммиаком. Смесь выдерживают несколько часов при 0 °C. Образовавшийся осадок отфильтровывают, промывают холодной водой и кристаллизуют из воды. Из-за небольшого различия в растворимости нитроаргинина в горячей и холодной воде кристаллизацию удобно проводить небольшими порциями, используя маточник для очистки следующих порций нитроаргинина. Выход продукта 90 г (86,5 %), т.пл. 255 °C (с разложением), $[\alpha]_D^{25} = +24,1$ ($c=1,9$, 2 н. соляная кислота).

Методика 178. *ω*-Тозил-*L*-аргинин [284]

12,5 г (40 ммоль) карбобензоксиаргинина растворяют в смеси 40 мл 4 М едкого натра и 320 мл ацетона, охлаждают до 0 °C и небольшими порциями добавляют при перемешивании 19 г *p*-толуолсульфохлорида в 60 мл ацетона. Реакционную массу размешивают 2 ч при 0 °C, подкисляют до pH 5,0 соляной кислотой. Ацетон отгоняют на роторном испарителе, а остаток обрабатывают эфиром (2х30 мл) для удаления избытка *p*-толуолсульфохлорида. Продукт экстрагируют из водного раствора 150 мл этилацетата. Соединенные органические вытяжки промывают водой, а *N*-карбобензоокси-*ω*-тозиларгинин экстрагируют 5 %-ным раствором бикарбоната натрия. Раствор при размешивании осторожно подкисляют до pH 3,0, продукт экстрагируют 150 мл этилацетата. Органическую фазу промывают 2 М *HCl*, водой и сушат сульфатом магния, а

этилацетат отгоняют в вакууме. Остаток в виде густого сиропа затвердевает при стоянии над P_2O_5 . Пересаживание из этилацетата петролейным эфиром при охлаждении до $-70^\circ C$ дает 13,5 г аморфного продукта (75 %), т.пл. $75-85^\circ C$, $[\alpha]_D^{25} = -1,3^\circ$ ($c=2$, метанол).

Полученный N^{α} -Кбз- ω -тозиларгинин гидрируют над палладиевой чернью в смеси метанол - уксусная кислота - вода (6:1:1). После удаления катализатора растворитель отгоняют, остаток растворяют в минимальном количестве кипящей воды и оставляют кристаллизоваться при $0^\circ C$. Образовавшийся продукт отфильтровывают и сушат. Выход 80 %, т.пл. $146-150^\circ C$, $[\alpha]_D^{25} = -6,1^\circ$ ($c=1$, метанол).

Методика 179. N^{α} -Карбобензокои- ω -метоксибензолсульфонил- L -аргинин-ДЦА-соль [285]

55,5 г (0,18 моль) карбобензокои- L -аргинина растворяют при комнатной температуре в смеси 180 мл 4 н. едкого натра и 1300 мл ацетона. Раствор охлаждают до $0^\circ C$ и при интенсивном перемешивании добавляют к нему по каплям в течение 30 мин раствор 74,4 г (0,36 моль) p -метоксибензолсульфохлорида в 300 мл ацетона. Перемешивание продолжают 2 ч при $0^\circ C$ и затем еще 2 ч при комнатной температуре, после чего реакционную смесь подкисляют раствором лимонной кислоты. Растворитель удаляют при пониженном давлении при температуре $40^\circ C$. Оставшееся масло растворяют в этилацетате и дважды промывают водой, а продукт экстрагируют 5 %-ным раствором бикарбоната натрия (3х 400 мл), водный слой подкисляют осторожно лимонной кислотой и выпавшее масло экстрагируют этилацетатом. Органический слой дважды промывают раствором лимонной кислоты, затем водой и сушат сульфатом магния. После удаления растворителя получают 86 г продукта в виде масла. Его растворяют в 600 мл этилацетата, к полученному раствору добавляют 36 мл (0,18 моль) дициклогексилamina и смесь оставляют на ночь в холодильнике. Выпавшие кристаллы ДЦА-соли отфильтровывают и кристаллизуют из ацетонитрила. Выход 77 г (61,1 %), т.пл. $110-112^\circ C$, $[\alpha]_D^{25} = +5,1^\circ$ ($c=1$, метанол).

Методика 180. ω - p -Метоксибензолсульфонил- L -аргинин [285]

2 г (4,2 ммоль) N^{α} -Кбз- ω - p -метоксибензолсульфонил- L -аргинина в виде масла растворяют в 20 мл метанола и гидрируют в течение 3 ч в присутствии 0,2 г палладиевой черни. Катализатор удаляют фильтрованием, метанол упаривают в вакууме, а остаток кристаллизуют из воды. Выход 0,9 г (63 %), т.пл. $144-146^\circ C$, $[\alpha]_D^{25} = -6,1^\circ$ ($c=0,7$, метанол).

Это соединение авторы работы [285] использовали для синтеза пептидов с С-концевым аргинином. При этом N -защищенная аминокислота в виде p -нитрофенилового эфира сочеталась с триэтиламмонийной солью ω - p -метоксибензилсульфониларгинина в ДМФА.

Для синтеза пептидов с С-концевым аргинином весьма удобно использовать также p -нитробензиловый эфир ω - p -метоксибензилсульфониларгинина, который получается обработкой соответствующего Кбз-производного 25 %-ным раствором бромистого водорода в уксусной кислоте.

Методика 181. p -Нитробензиловый эфир ω - p -метоксибензилсульфонилкарбобензоокси- L -аргинина [285]

К суспензии 7 г (0,01 моль) ДЦА-соли Кбз- ω - p -метоксибензилсульфонил- L -аргинина в 200 мл этилацетата в делительной воронке прибавляют 60 мл 0,2 н. серной кислоты, охлажденной до $0^\circ C$. Воронку встряхивают до тех пор, пока весь продукт не растворится. Органический слой дважды промывают водой и сушат сульфатом натрия. Растворитель удаляют на ротационном испарителе, а остаток растворяют в 30 мл диметилформамида; к полученному раствору добавляют 1,68 г (0,012 моль) триэтиламина и 2,5 г (0,012 моль) p -нитробензилобромида. Смесь перемешивают 2 ч при $80^\circ C$, а затем выливают в 300 мл воды. Выпавшее масло растворяют в этилацетате, органическую фазу промывают 0,1 н. соляной кислотой, а затем - 5 %-ным раствором бикарбоната натрия и сушат сульфатом натрия. После удаления этилацетата в вакууме полученное масло растирают с петролейным эфиром. Выход аморфного продукта составляет 6,2 г (100 %), т.пл. $90-110^\circ C$, $[\alpha]_D^{25} = -3,4^\circ$ ($c=0,59$, ДМФА).

Методика 182. Трикарбобензоокси- L -аргинин [181]

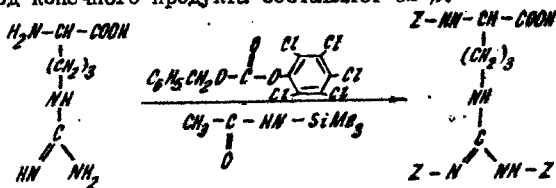
Раствор 35 г (0,2 моль) L -аргинина в 200 мл 1 н. раствора едкого натра охлаждают до $-10^\circ C$ и при интенсивном размешивании добавляют 100 мл предварительно охлажденного 2 н. раствора едкого натра и 27 мл свежеприготовленного карбобензоокси-хлорида, а затем через каждые 3-4 мин еще прибавляют 4 порции по 100 мл 2 н. NH_4OH и 27 мл Кбз-хлорида. После добавления реагентов смесь интенсивно перемешивают при охлаждении в течение 30 мин. Выпавший бесцветный осадок отфильтровывают на холоду, быстро отжимают на фильтре, промывают с помощью 100 мл холодного раствора 5 %-ного карбоната натрия, снова быстро отжимают. Полученную таким образом натриевую соль растворяют в 800 мл хлороформа и после удаления водного слоя органический слой последовательно промывают 5 %-ным раствором карбоната натрия (2х

х100 мл), 2 н. серной кислотой (2х100 мл), водой до pH 7,0 и нако- нец сушат сульфатом натрия. Хлороформ упаривают на роторном испари- теле почти досуха, а его следы удаляют путем добавления абсолютно- го спирта и последующей его отгонки в вакууме. К остатку прибавля- ют 200 мл горячего раствора 27 г ацетата натрия в этиловом спирте, смесь кипятят 2 мин при размешивании, а затем оставляют при комнат- ной температуре на 20 ч. При этом выпадает натриевая соль трикарбо- бензокси-*L*-аргинина в виде игл. Ее отфильтровывают, промывают 30 мл абсолютного спирта и осадок экстрагируют 100 мл кипящего этилацета- та. Раствор охлаждают до 0 °С, выпавший осадок отфильтровывают, про- мывают 20 мл холодного этилацетата и вновь растворяют в минимальном количестве горячего абсолютного этилового спирта. После выдержи- вания раствора в холодильнике в течение 24 ч выпавший осадок отфиль- тровывают, промывают холодным абсолютным этиловым спиртом, а затем эфиром. Выход натриевой соли трикарбобензокси-*L*-аргинина составля- ет 21–24 г (20 %).

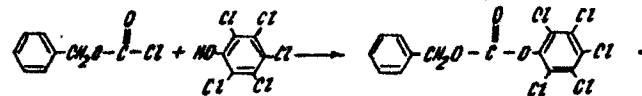
Полученную соль (5 г) суспендируют в 200 мл этилацетата и пере- водят в раствор путем интенсивного встряхивания с 50 мл 2 %-ной сер- ной кислоты. Органический слой отделяют и промывают сначала 50 мл 2 %-ной серной кислоты, а затем три раза - водой, сушат безводным сульфатом натрия и этилацетат упаривают в вакууме досуха. Получен- ный кристаллический продукт растирают с петroleйным эфиром и отсасы- вают; выход 3,8 г, т.пл. 135 °С. После двукратной перекристаллизации из этилацетата т.пл. 138–139 °С, $[\alpha]_D^{25} = +15,5^{\circ}$ ($c=1$, этиловый спирт).

Приведенная выше методика синтеза трикарбобензоксикаргинина до- вольно трудоемка и приводит к низкому выходу конечного продукта. Более высокий выход можно получить по методике, предложенной Виншем и Вендельбергом [320], по которой синтез трикарбобензоксикаргинина ведут аналогично, но исходя из *N*-карбобензоксикаргинина (выход 32 %).

По-видимому, лучшим является метод, предложенный Смитвиком и Шуманом [321], который заключается в предварительном триметилокси- лировании аргинина с последующим его бензилоксикарбонилированием. Общий выход конечного продукта составляет 52 %.



Методика 183. Бензилпентахлорфенилкарбонат [322]



170,59

266,34

400,47

К раствору 13,32 г пентахлорфенола (0,05 моль) и 6,45 г (0,05 моль) хинолина в 100 мл хлористого метилена добавляют 8,5 г (0,05 моль) карбобензоксиклорида в течение 15 мин. Реакционную смесь выдерживают в течение ночи, промывают 1 н. *HCl* (2х50 мл), 0,5 н. *NaHCO*₃ (4х50 мл), водой (2х50 мл), сушат сульфатом натрия и удаляют в вакууме растворитель. Продукт кристаллизуют из толуола. Выход 16,0 г (78 %), т.пл. 115–116 °С.

Методика 184. Трикарбобензокси-*L*-аргинин [321]

Литиевая соль трикарбобензокси-*L*-аргинина. К 210 мл сухого ДМФА добавляют 20,88 г (0,12 моль) *L*-аргинина и 160 г (0,4 моль) бензилпентахлорфенилкарбоната. Полученную суспензию нагревают при перемешивании до 60 °С, вносят 78,6 г (0,6 моль) *N*-триметилокси- ацетамид и перемешивают 60 ч при 60 °С. После прибавления 20 мл воды в реакционную смесь ДМФА удаляют в вакууме. Остаток растворя- ют в абсолютном спирте и этот раствор добавляют к горячему насыщен- ному раствору 50 г ацетата лития в спирте. Полученную смесь медленно охлаждают до комнатной температуры и затем выдерживают в течение ночи при 4 °С. Образовавшийся осадок отфильтровывают, обрабатывают горячим этилацетатом и затем перекристаллизуют из минимального количества метанола. Выпавший осадок отделяют фильтрацией и сушат в вакууме. Выход 39 г (56 %), т.пл. 153–155 °С. Аналитический образец, полученный кристаллизацией из смеси метанол - ацетон, плавится в ин- тервале температур 156–157 °С, $[\alpha]_D^{25} = +10,6^{\circ}$ ($c=1,5$, метанол).

Трикарбобензокси-*L*-аргинин. Литиевую соль трикарбобензокси-*L*- аргинина (10 г; 0,017 моль) суспендировали в этилацетате. Получен- ную суспензию нейтрализовали добавлением 2 %-ной серной кислоты. Этил- ацетатный слой отделяли, сушили сульфатом магния и удаляли в ваку- уме. Остаток перекристаллизовывали из этилацетата и сушили в вакууме. Выход 9,1 г (92 %), т.пл. 138–139 °С, $[\alpha]_D^{25} = +15,1^{\circ}$ ($c=1,5$, хло- роформ).

По этой методике был получен *p*-метоксибензилоксикарбонил-*N'*, *N'*-

дибензилоксикарбонил с выходами: на первой стадии 63 % (т.пл. 209–210 °C), $[\alpha]_D^{25} = +9,9^\circ$ (с=1, метанол); на второй стадии 91 % (т.пл. 139–141 °C), $[\alpha]_D^{25} = +16,6^\circ$ (с=1,5, хлороформ).

Синтез *N*-триметилсилилацетамида описан в гл. 3, раздел 3.3.

Методика 185. 1-Хлорформилоксиадамантан [286]

К раствору 30 г фосгена¹ в 100 мл сухого бензола добавляют по каплям в течение 1 ч при перемешивании и охлаждении до 4 °C раствор 8 г 1-оксиадамантана и 7 г пиридина в 200 мл бензола. После того как выпадет бесцветный осадок, добавляют еще примерно 100 мл бензола. Реакционную смесь выдерживают 1 ч при комнатной температуре, а затем выпавшие соли отфильтровывают, а раствор промывают ледяной водой. Органический слой сушат сульфатом натрия, растворитель упаривают при 20 °C до одной пятой первоначального объема и оставляют в холодильнике. Полагают, что выход продукта количественный. Можно выделить 1-хлорформилоксиадамантан в твердом виде с т.пл. 46–47 °C после упаривания раствора досуха и кристаллизации осадка из петролейного эфира при –20 °C.

Методика 186. *N*¹-Бензилоксикарбонил-*N*⁴,*N*²-ди(адамантил-1-оксикарбонил)-*L*-аргинин [286]

К раствору 20,7 г (67 ммоль) Кбз-аргинина в 40 мл диоксана и 134 мл 2 н. раствора *NaOH* при непрерывном размешивании и охлаждении до 6–8 °C добавляют в течение 1 ч по каплям одновременно раствор 57,4 г (268 ммоль) свежеприготовленного 1-хлорформилоксиадамантана в 50 мл диоксана и 200 мл 2 н. раствора едкого натра. Спустя 3 ч непрерывного размешивания при 5–8 °C массу центрифугируют и осадок растирают с эфиром, отсасывают и промывают эфиром. Растворитель удаляют на ротормном испарителе, а остаток растирают с петролейным эфиром, отсасывают и промывают петролейным эфиром, потом суспендируют в воде и подкисляют 0,5 М лимонной кислотой до pH 2–3. Выпавший продукт извлекают эфиром, органический слой сушат сульфатом натрия, эфир удаляют на ротормном испарителе. Остаток в виде пены кристаллизуют из смеси метанол – вода. Выход 39,2–41,1 г (88–92 %), т.пл. 120–122 °C с разложением, $[\alpha]_D^{25} = +20,8^\circ$ (с=1, хлороформ). Ниже приведен пример использования незащищенного по гуанидиновой группе *N*¹-бензилоксикарбониларгинина в качестве *N*-концевой аминокислоты.

¹ Установка для получения жидкого фосгена описана в разделе 2.3.1.

Методика 187. Дибромгидрат метилового эфира карбобензоксик-*L*-аргинил-*L*-аргинина [324]

Суспензию 154 г (0,50 моль) карбобензоксик-*L*-аргинина и 193 г (0,55 моль) дибромгидрата метилового эфира *L*-аргинина в 1500 мл сухого пиридина перемешивают 20 мин при температуре 0 °C, а затем вносят 124 г (0,60 моль) дициклогексилкарбодимид. Реакционную смесь выдерживают 16 ч при 20 °C, образовавшуюся дициклогексимочевину отфильтровывают, а растворитель упаривают. Остаток растирают с эфиром и затем продукт суспендируют в ацетоне (1 л). После фильтрования ацетон удаляют в вакууме и получают 259 г (81 %) дипептида, т.пл. 115–120 °C, $[\alpha]_D^{25} = -10^\circ$ (с=2, метанол).

Удаление боковых защитных групп аргинина

Нитрогуанидиновая группа обычно деблокируется при каталитическом гидрогенолизе; аналогично отщепляется карбобензоксигруппа. Указанные защитные группировки, а также тозилъная группа гладко отщепляются безводным фтористым водородом. Эту методику используют в основном при твердофазном методе синтеза пептидов [8]. Метоксибенилсульфонильная группа легко удаляется метансульфокилотой или трис-(трифторацетатом)бора [285].

Методика 188. Деблокирование гуанидиновой группы *ω*-нитроаргинина

ω-Нитрогруппу нитроаргинина отщепляют при каталитическом гидрировании над палладием (см. раздел 2.3.1). Для этих целей можно также использовать другие восстановители, например двухлористое олово [319] или цинк в трифторуксусной кислоте [323].

Удаление нитрогруппы гидрированием над палладиевой чернью продолжается обычно 12–30 ч; иногда для этого требуется повышенная температура. Для удаления нитрогруппы весьма удобны методы восстановления без применения водорода (см. раздел 2.3.1). Например, при обработке нитроаргинина муравьиной кислотой или форматом аммония в присутствии палладия защитная группа отщепляется в первом случае за 5 ч, а во втором – за 10 мин. Практика нашей работы показала, что нитрогруппа легко удаляется циклогексеном, в частности, при этом легко деблокируются те нитроаргининосодержащие пептиды, которые плохо деблокируются каталитическим гидрированием.

К суспензии 745 мг (1,05 ммоль) Вос-фенилаланил-нитроаргинил-триптофанил-глицина в 14 мл циклогексена добавляют 28 мл этилового спирта и 3 мл уксусной кислоты. При непрерывном размешивании в колбу вносят 75 мг овежеприготовленной палладиевой черни и смесь кипятят до полного деблокирования пептида, что контролируют с помощью ТСХ; обычно на это требуется около 6 ч. Катализатор отфильтровывают, растворитель удаляют на ротонном испарителе при температуре не выше 40 °С, а остаток промывают водой для удаления ацетата аммония. Продукт сушат в вакуум-эвекторе и после растворения его в метаноле осаждают этилацетатом. Выход Вос-фенилаланил-аргинил-триптофанил-глицина 670 мг (88 %), т.пл. 175–180 °С.

Методика удаления нитрогруппы безводным фтористым водородом описана в монографии [8].

Из других защитных групп гуанидиновой функции аргинина рассмотрим удаление ω -п-метоксифенилоульфонильной (MBS-группы). Как известно, MBS-группа устойчива к действию бромистого водорода в уксусной кислоте, но легко отщепляется безводным фтористым водородом, трис-(трифторацетатом) бора и метансульфокислотой.

Методика 190. Удаление MBS-группы метансульфокислотой [285]

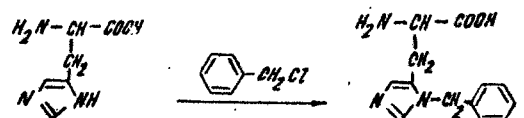
34,4 г (0,1 ммоль) ω -MBS-аргинина обрабатывают при комнатной температуре 0,5 мл метансульфокислоты, содержащей 0,025 мл анизола, в течение 40 мин, затем к смеси добавляют 10 мл эфира и выпавшее масло многократно растирают с эфиром.

4.4. ЗАЩИТА ИМИДАЗОЛЬНОГО КОЛЬЦА ГИСТИДИНА

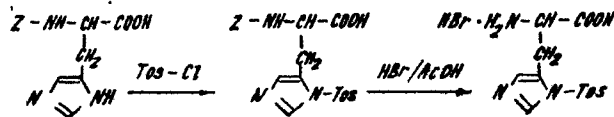
Несмотря на то, что имидазольное кольцо гистидина обладает основными свойствами, ряд пептидов, содержащих гистидин, был синтезирован без защиты этого ядра. Хотя при этом не было отмечено побочных реакций, использование свободного гистидина вызывает некоторые затруднения, в частности – невозможность промывания продукта реакции разбавленной кислотой, поскольку гистидинсодержащие пептиды растворяются в кислых растворах. Применение N_α , N^{im} -дикарбобензоил-гистидина устраняет это затруднение. Однако данное соединение обладает одним существенным недостатком: оно крайне неустойчиво при хра-

нении. В связи с этим реагент не нашел широкого применения при синтезе пептидов. Для блокирования имидазольного кольца гистидина в настоящее время успешно используют N^{im} -бензил-гистидин, который был предложен еще де Виньо и Беренсом [288]. Бензильную группу можно удалить натрием в жидком аммиаке или при каталитическом гидрировании в течение 72 ч. Гидрирование над палладием в присутствии циклогексена позволяет отщепить бензильную группу за 3 ч (см. раздел 2.3.1). Для введения гистидина в N -концевую часть молекулы пептида используют ди-трет-бутилоксикарбонилгистидин [289]. В последние годы в качестве весьма удобной защитной группы имидазольного кольца гистидина находят применение тозилная группа [291]. Ее можно легко удалить 1-оксобензотриазолом или ангидридами карбоновых кислот в пиридине [291, 325].

Методика 191. N^{im} -Бензил- L -гистидин [288]



В круглодонную трехгорлую колбу вместимостью 500 мл, снабженную мешалкой с ртутным затвором и содержащую 200 мл безводного жидкого аммиака, добавляют 20 г монохлоргидрата L -гистидина, охлаждая колбу до -70 °С смесью сухого льда и трихлорэтилена. При размешивании к реакционной массе добавляют небольшими порциями 9 г натрия до появления устойчивой синей окраски раствора, после чего смесь обесцвечивают добавлением небольшого количества гистидина. К светло-коричневой реакционной смеси, содержащей бесцветный осадок, при интенсивном перемешивании медленно добавляют по каплям 12 мл хлорного бензола. Перемешивают еще 30 мин и оставляют при комнатной температуре для испарения большей части аммиака. Следы аммиака удаляют в вакууме. Остаток растворяют в 100 мл воды, охлажденной до 0 °С; полученный раствор тотчас же промывают эфиром, а затем через водный слой просасывают воздух с помощью водоструйного насоса до исчезновения запаха эфира. Раствор фильтруют и при размешивании медленно добавляют 2 н. серную кислоту до начала выпадения осадка (pH 8–8,5). Смесь оставляют на 3 ч при 0 °С, выпавший осадок фильтруют, промывают и кристаллизуют из 70 %-ного спирта. Выход бензилгистидина – 13,4 г (57 %), т.пл. 248–249 °С, $[\alpha]_D^{25} = +20,5^\circ$ (с=2, вода с 1 эквивалентом HCl).



Методика 192. Карбобензоил- N^{im} -тозил- L -гистидин [291]

К раствору 10 г (35 ммоль) Кбз-гистидина и 7 г Na_2CO_3 в 100 мл воды при энергичном перемешивании и охлаждении до $-10^\circ C$ добавляют порциями 9 г (47 ммоль) p -толуолсульфохлорида в течение 30 мин. Реакционную смесь размешивают потом 4 ч при комнатной температуре, а затем промывают эфиром (2х50 мл) для удаления избытка p -толуолсульфохлорида. Водную фазу отделяют, подкисляют 1 н. соляной кислотой до pH 2,0, и масло экстрагируют этилацетатом (3х100 мл). Соединенные вытяжки сушат сульфатом магния, и органический растворитель удаляют в вакууме. Остаток растворяют в 100 мл этилацетата, добавляют 5,5 г дициклогексоламина и оставляют кристаллизироваться. Образовавшийся осадок ДЦГА-соли отфильтровывают, и продукт кристаллизуют из смеси метанол - этилацетат. Выход 15,4 г (70,5 %), т.пл. $151-152^\circ C$ (с разложением), $[\alpha]_D^{25} = +19,1^\circ$ ($c=1$, ДМФА).

Методика 193. N^{im} -Тозил- L -гистидин [290]

Суспензию 10 г (16 ммоль) ДЦГА-соли Кбз- N^{im} -тозил- L -гистидина в 1 н. серной кислоте энергично встряхивают в делительной воронке с этилацетатом. После растворения осадка органический слой промывают водой до pH 7,0 и сушат сульфатом магния. Этилацетат удаляют в вакууме водоструйного насоса, а остаток обрабатывают в течение 1 ч 20 мл 4 н. раствора бромистого водорода в ледяной уксусной кислоте при комнатной температуре. Продукт осаждают добавлением 200 мл сухого эфира, быстро отфильтровывают, промывают сухим эфиром. После выдерживания в вакуум-экзикаторе над едким натром бромгидрат тозилгистидина растворяют в 100 мл метанола и тозилгистидин осаждают, добавляя 6 мл сухого пиридина для связывания HBr . Осадок отфильтровывают и тщательно промывают спиртом. Выход 3,5 г (51,7 %), т.пл. $140-145^\circ C$.

Из тозилгистидина обычными методами могут быть получены его N^x -защищенные производные. В табл. 43 приведены формулы некоторых из них и физико-химические характеристики.

Таблица 43. Строение и свойства N^x -защищенных производных N^{im} -тозилгистидина

Формула соединения	Т.пл., $^\circ C$	$[\alpha]_D^{25}$, градус ($c=1$)
$Boc-His(Tos)-OH$	160-162	+26,5 (метанол)
$Aoc-L-His(Tos)-OH$	109-111	+10,0 (пиридин)
$Boc-L-His(Tos)-OH$	123-125	+15,1 (метанол)
$Nps-L-His(Tos)-OH$	141-142	+39,9 (ДМФА)

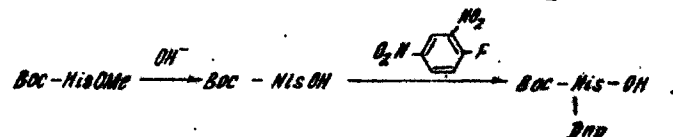
Удаление тозильной группы N^{im} -тозилгистидина. Защитная группа N^{im} -тозилгистидина устойчива к каталитическому гидрированию, к действию трифторуксусной кислоты или бромистого водорода. Ее можно удалить 1 н. раствором $NaOH$ (1 ч, $20^\circ C$), безводным фтористым водородом (30 мин, $0^\circ C$), 1-оксисбензтриазолом (1 ч, $20^\circ C$), натрием в жидком аммиаке и наконец ангидридами карбоновых кислот в пиридине.

Методика 194. Удаление защитной группы N^{im} -тозилгистидилпептидов

1. К раствору 1 моль защищенного пептида в тетрагидрофуране или диксане добавляют 2 моль 1-оксисбензтриазола в тех же растворителях и выдерживают при комнатной температуре в течение 1 ч. Выделение пептида ведут обычными методами [290].

2. К смеси 25 мл уксусного ангидрида и 0,5 мл пиридина добавляют 2,6 ммоль защищенного пептида и раствор перемешивают 3,5 ч при комнатной температуре. Выделяют пептид, как обычно [325].

Методика 195. Синтез трет-бутилоксикарбонил- N^{im} -динитрофенилгистидина [291]



2,7 г (10 ммоль) метилового эфира трет-бутилоксикарбонил- L -гистидина растворяют в 20 мл спирта и добавляют 10 мл 1 н. $NaOH$. Через 45 мин раствор нейтрализуют при $0^\circ C$ 1 н. раствором HCl и отгоняют спирт на роторном испарителе. К полученному раствору доливают раствор 2,3 г $NaHCO_3$ в 10 мл воды, а затем медленно прибавляют раствор 1,4 мл 2,4-динитрофторбензола в 15 мл метанола в течение 1 ч. Реакционную смесь оставляют на 10 ч при комнатной температуре. Метанол отгоняют на роторном испарителе, а водную фазу промывают

эфиром (3 раза по 20 мл), подкисляют до pH 3,5 1 н. HCl при 0 °C и экстрагируют 3 раза по 20 мл этилацетата. Экстракты соединяют, промывают водой, сушат над сульфатом магния и отгоняют этилацетат в вакууме. Маслянистый остаток трижды кристаллизуют из смеси этанол - петролейный эфир (т.кип. 30-60 °C). Выход 2,6 г (62 %), т.пл. 94 °C; $[\alpha]_D^{20} = +55,3^\circ$ (с=1, этилацетат).

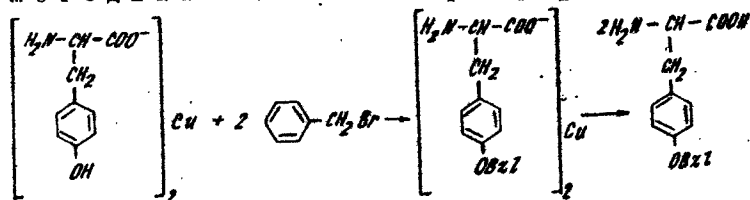
4.5. ЗАЩИТА ГИДРОКСИЛЬНОЙ ГРУППЫ ТИРОЗИНА

Из-за высокой реакционной способности оксигруппы тирозина ее, как правило, защищают при синтезе тирозинсодержащих пептидов. Для этой цели чаще всего применяют бензильную защиту, которая в бромистом водороде более устойчива, чем Кбз-группа. Бензильную защиту можно легко удалить каталитическим гидрогенолизом. Обычно применяют N-защищенные производные бензилтирозина, а также его метиловые, этиловые и бензиловые эфиры. Помимо бензильной защиты для блокирования гидроксильной тирозина нашла применение также трет-бутильная группа [298], а в твердофазном методе синтеза пептидов для тех же целей предложены 3-бромбензил- и 2,6-дихлорбензильные производные [295], которые в 50 раз более устойчивы, чем O-бензилтирозин при обработке пептидов трифторуксусной кислотой. Бензильная и замещенные бензильные группы отщепляются при обработке безводным фтористым водородом в течение 1 ч.

Для получения пептидов с N-концевым остатком тирозина удобно применять N,O-дикарбообензоилтирозин. После завершения синтеза обе Кбз-группы можно легко удалить каталитическим гидрированием.

В твердофазном методе синтеза пептидов широкое применение нашел O-2,6-дихлорбензил-L-тирозин, который оказался более устойчивым, чем O-бензилтирозин в условиях многократной обработки пептидильного полимера трифторуксусной кислотой. После завершения синтеза защитная группа легко удаляется безводным фтористым водородом в течение 1 ч при 0 °C.

Методика 196. O-Бензил-L-тирозин [294]



К раствору 72,4 г (0,4 моль) L-тирозина в 200 мл 2 н. едкого натра прибавляют водный раствор 49,9 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и нагревают некоторое время на водяной бане. После охлаждения выпавший медный комплекс растворяют, добавляя 1500 мл метанола и 200 мл 2 н. едкого натра, после чего за один прием в реакционную колбу добавляют 50 мл бензилбромид. Смесь размешивают 1 ч при комнатной температуре. Выпавший медный комплекс O-бензил-L-тирозина отфильтровывают, промывают на фильтре смесью метанол - вода (1:3,5), затем сушат до постоянной массы при 60 °C. Выход продукта 88-96 г (72-79 %).

Полученный комплекс многократно растирают с 1 н. HCl, отсасывают и последовательно промывают на фильтре водой, разбавленным аммиаком и смесью ацетон - эфир. После кристаллизации из 80 %-ной уксусной кислоты получают 66-72 г (60-65 %) бесцветных кристаллов с т.пл. 223 °C, $[\alpha]_D^{25} = -9,9^\circ$ (с=1, 80 %-ная уксусная кислота).

Методика 197. N,O-Дикарбообензоокси-L-тирозин [326]

К раствору 11,5 г (0,06 моль) L-тирозина в 60 мл 2 н. едкого натра поочередно добавляют небольшими порциями в течение 1 ч при 0 °C 25 г (21 мл) карбообензоисхлорида и 40 мл 4 н. едкого натра. Реакционную смесь интенсивно перемешивают и скорость подачи реагентов регулируют таким образом, чтобы кислотность среды поддерживалась при pH 9-11. Перемешивание продолжают до тех пор, пока температура раствора не достигнет 20 °C, после чего раствор экстрагируют эфиром (2x100 мл), водный слой отделяют и подкисляют 4 н. HCl до pH 3, выпавший продукт экстрагируют эфиром (2x100 мл), органическую фазу промывают водой, сушат сульфатом магния, растворитель упаривают на роторном испарителе, а остаток дважды кристаллизуют из четыреххлористого углерода. Выход 25,3 г (89 %), т.пл. 117 °C, $[\alpha]_D^{25} = -5,0^\circ$ (с=1, 10 %-ная уксусная кислота).

Методика 198. O-(2,6-Дихлорбензил)-L-тирозин [295]

К раствору 3,6 г (20 ммоль) L-тирозина в 40 мл (40 ммоль) 1 М едкого натра добавляют при перемешивании 17 г (10 ммоль) $\text{SiCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 20 мл метанола. Зеленовато-голубой осадок вскоре растворится при перемешивании. К реакционной массе добавляют раствор 4,5 г (18,8 ммоль) 2,6-дихлорбензилбромида в 25 мл метанола; она приобретает темно-голубую окраску. Смесь размешивают 13 ч при комнатной температуре, а затем фильтруют. Осадок на фильтре последовательно промывают смесью вода - метанол (1:1 по объему), эфиром (2x50 мл), затем растворяют

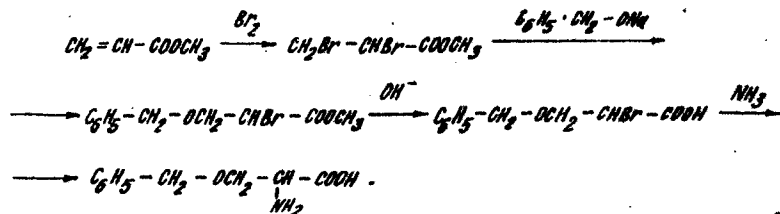
в горячей смеси 50 мл уксусной кислоты, 17 мл 1 М HCl и 2,92 г (10 ммоль) ЭДТА. Горячий голубой раствор фильтруют, удаляя нерастворившуюся ЭДТА, разбавляют 400 мл холодной воды. Образовавшуюся желеобразную массу отделяют на фильтре, хорошо промывают водой и сушат в вакууме. Выход 2,64 г (41 %), т.пл. 211–212 °C, $[\alpha]_D^{25} = -10,6^\circ$ ($c=2$, 80 %-ная уксусная кислота).

трет-Бутилоксикарбонил-О-(2,6-дихлорбензил)-L-тирозин [298] может быть получен любым из указанных ранее способов введения Вос-группы (см. раздел 2.3.2). Его т.пл. 108–110 °C, $[\alpha]_D^{25} = +21,0^\circ$ ($c=2$, этиловый опирт).

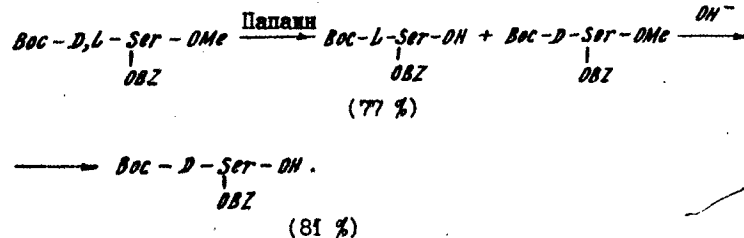
4.6. ЗАЩИТА ГИДРОКСИЛЬНОЙ ГРУППЫ СЕРИНА И ТРЕОНИНА

Довольно часто остатки серина и треонина вводят в растущую полипептидную цепь без защиты гидроксильной группы этих аминокислот. Однако возможность побочных реакций привела к пониманию того, что лучше использовать при синтезе пептидов производные серина и треонина с блокированной OH-группой. Наиболее широко блокирование гидроксильной группы серина и треонина достигается за счет превращения его в соответствующие бензиловые или трет-бутиловые эфиры.

Синтез О-бензил-L-серина до недавнего времени был сопряжен с рядом трудностей. Окава [327] впервые получил D,L-(О-бензил)-серин по следующей схеме:



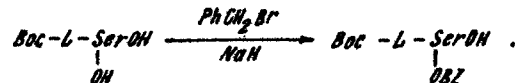
Оптически чистый О-бензил-L-серин был выделен при расщеплении D,L-изомера N^{α} -ацетил-О-бензил-серина ферментом такадиэстеразой. Вили и Ферст разработали способ разделения рацемического N^{α} -формил-(О-бензил)-D,L-серина на оптические антиподы через соли с брүкцином или хинином [328]. По-видимому, более удобным методом разделения рацемического продукта является преимущественный гидролиз одного из изомеров, как это было осуществлено Чи-Хуэй Вонгом с соавт. при обработке метилового эфира N^{α} -Вос-(О-бензил)-D,L-серина папайном [329]:



В лабораторных условиях более пригоден метод синтеза Вос-(О-бензил)-L-серина, предложенный Сугано и Мийоши [301].

Удаление О-бензиловой защитной группы осуществляется довольно легко безводным фтористым водородом или же каталитическим гидрогенолизом в присутствии палладия.

Методика 199. трет-Бутилоксикарбонил-(О-бензил)-L-серин [301]



К раствору 2,05 г (10 ммоль) Вос-L-серина в 50 мл диметилформамида добавляют при 0 °C 820 мл (22 ммоль) 65 %-ного гидрида натрия; при этом выделяется водород. Когда водород перестанет выделяться, к раствору прибавляют 1,88 г (11 ммоль) свежеперегнанного бензилбромид и реакционную массу размешивают 5 ч при 25–30 °C. Растворитель удаляют в вакууме на ротарном испарителе при температуре 40 °C, остаток растворяют в 50 мл воды и экстрагируют эфиром (2x20 мл). Водную фазу отделяют и подкисляют 3 н. HCl до pH 3,5, а продукт экстрагируют этилацетатом (5x20 мл). Комбинированные органические вытяжки промывают водой, сушат сульфатом магния. После удаления этилацетата в вакууме получают бесцветное масло; его растворяют в 30 мл эфира и добавляют 0,9 г дициклогексиламина. Осадок отфильтровывают и кристаллизуют из этилацетата. Выход 2,2 г (47 %), т.пл. 159–160 °C, $[\alpha]_D^{25} = +29,0^\circ$ ($c=1$, метанол).

Методика 200. трет-Бутиловый эфир
О-трет-бутил-L-серина [302]

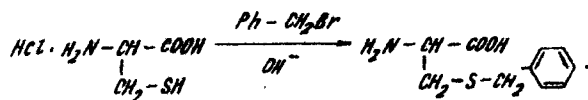
Суспензию 2,1 г (20 ммоль) L-серина в 20 мл диоксана смешивают при 0 °C с 1,5 мл концентрированной серной кислоты и 5,4 мл изобутилена и встряхивают в течение 3 дней при комнатной температуре.

Затем реакционную массу нейтрализуют триэтиламином, растворитель упаривают на ротормном испарителе, остаток растворяют в этилацетате и промывают насыщенным раствором бикарбоната натрия, сушат сульфатом натрия и растворитель отгоняют на ротормном испарителе. Остаток перегоняют в вакууме и получают продукт, кипящий при 70–71 °C (120 Па), в виде масла с выходом 83 %, $[\alpha]_D^{25} = -2,9^\circ$ ($c=1$, метанол). Условия удаления О-трет-бутильной группы: HBr/TFA или HCl/TFA 30 мин, TFA – 6 ч.

4.7. ЗАЩИТА МЕРКАПТОГРУППЫ ЦИСТЕИНА

Несмотря на значительное количество защитных групп, предложенных для блокирования SH -группы цистеина, поиск новых реагентов продолжается, поскольку каждая из используемых групп имеет ряд недостатков. Наиболее широко применяемой защитной группой является S -бензильная группировка, предложенная еще в 1935 г. Зиффердом и ДюВиньо [331]. Эта защитная группа гладко удаляется натрием в жидком аммиаке или безводным фтористым водородом при комнатной температуре. В еще более мягких условиях отщепляется безводным фтористым водородом p -метоксибензильная группа, введенная в пептидный синтез Сакакибара с остр. [332]; ее целесообразно использовать в твердофазном методе синтеза пептидов. Из новых защитных групп перспективны, по видимому, ацетамидометильная и бензамидометильная группы, они легко удаляются ионами ртути в кислой среде.

Методика 201. S -Бензил- L -цистеин [304]



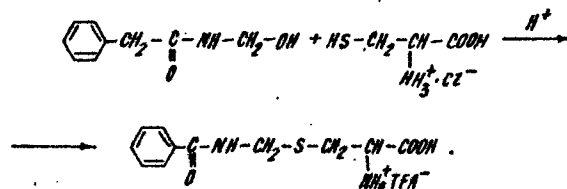
Раствор 157,5 г (1 моль) хлоргидрата L -цистеина в 2 л охлажденного раствора едкого натра смешивают с 256,5 г (1,5 моль) бензилабромидом. Смесь встряхивают несколько часов до образования гомогенного раствора, после чего подкисляют уксусной кислотой до pH 5,0. Образующийся осадок отфильтровывают, хорошо промывают водой и наконец сушат в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 . Выход 169 г (80 %), т.пл. 216–218 °C, $[\alpha]_D^{25} = +23,5^\circ$ ($c=1$, 1 н. $NaOH$).

Методика 202. N -Оксиметилбензамид [333]



В колбу емкостью 100 мл помещают 21 г (0,17 моль) бензамида, прибавляют 0,6 г карбоната калия в 21 мл воды и встряхивают при 50 °C, затем добавляют 12,3 мл формалина ($d=1,095$) и продолжают встряхивание при температуре не выше 50 °C до полного растворения бензамида. После этого реакционную смесь оставляют на 24 ч при комнатной температуре. Бесцветные кристаллы отфильтровывают, промывают холодной водой (2х5 мл), сушат и кристаллизуют из хлороформа (75 мл). Выход N -оксиметилбензамида 22 г (85 %), т.пл. 100–104 °C.

Методика 203. Трифторацетат S -бензамидометил- L -цистеина [306]



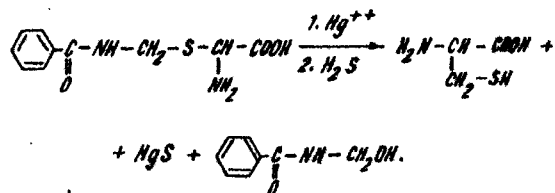
Смесь 3,61 г (10 ммоль) хлоргидрата L -цистеина и 4,53 г (10 ммоль) N -оксиметилбензамида в 30 мл безводной трифторуксусной кислоты перемешивают при комнатной температуре 45 мин. Растворитель удаляют в вакууме, а остаток растворяют в абсолютном спирте (30 мл), который затем упаривают на ротормном испарителе. Эту операцию повторяют дважды, а образовавшийся продукт обрабатывают эфиром, отсаивают и промывают эфиром, сушат в вакуум-эксикаторе над $NaOH$ и P_2O_5 . Кристаллизация из 95 %-ного спирта дает 6,6 г (60 %) продукта с т.пл. 169–171 °C, $[\alpha]_D^{25} = -33,3^\circ$ ($c=1$, вода).

Методика 204. трет-Бутилоксикарбонил- S -бензамидометил- L -цистеин [306]

Смесь 4,1 г (11,1 ммоль) трифторацетата S -бензамидометил- L -цистеина и 2,39 г (22,3 ммоль) тетраметилгуанидина в 30 мл безводного ДМФА перемешивают на ледяной бане. К охлажденной до 0 °C реакционной смеси добавляют по каплям одновременно 2,9 г (22,3 ммоль) Восгидразида и 2,39 г (22,3 ммоль) тетраметилгуанидина, массу размешивают.

вают при комнатной температуре 48 ч, а затем растворитель удаляют в вакууме. Остаток растворяют в 60 мл воды и экстрагируют эфиром (2x20 мл), водную фазу подкисляют кристаллической лимонной кислотой. Выделившееся масло экстрагируют 100 мл этилацетата, органический слой отделяют и промывают водой, ошугат сульфатом магния, растворитель удаляют на роторном испарителе, а оставшееся масло кристаллизуют из эфира. Выход 3,75 г (95 %), т.пл. 141–142 °С, $[\alpha]_D^{25} = -28,5^\circ$ ($c=1$, метанол).

Методика 205. Удаление *S*-бензамидометильной группы [306]



37 мг (0,1 ммоль) трифторацетата *S*-бензамидометил-*L*-глутеина растворяют при нагревании в 5 мл смеси метанол – вода (1:1). К прозрачному раствору добавляют при комнатной температуре 32 мг (0,1 ммоль) ацетата ртути и смесь перемешивают в течение 1 ч. Затем через раствор продувают в течение 10 мин ток сероводорода и образующийся осадок сульфида ртути удаляют фильтрованием. Деблокированный продукт выделяют обычным методом.

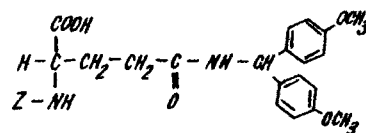
Вит-группа устойчива к действию щелочи, трифторуксусной кислоты, гидразингидрата и других аналогичных реагентов.

4.8. ЗАЩИТА АМИДНЫХ ГРУПП ГЛУТАМИНА И АСПАРАГИНА

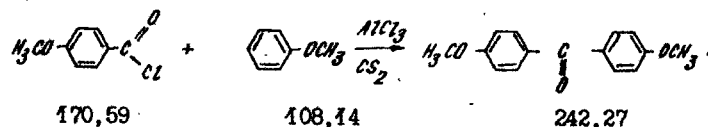
Как известно, введение в полипептидную цепь остатков glutammina и аспарагина карбодимидным методом сопровождается иногда побочной реакцией дегидратации амидной группы. Однако если при этом добавить эквимолярное количество 1-оксисбензотриазола или использовать активированные эфиры glutammina или аспарагина, то указанный нежелательный процесс не идет. Другим способом подавления этой побочной реакции является использование в синтезе аспарагин- или glutaminсодержащих пептидов их производных с блокированными амидными группами. Следует подчеркнуть, что при этом улучшается растворимость пептидов в органических растворителях, что было продемонстрировано, например, при синтезе бунгаротоксина [272].

4,4'-Диметоксибензгидрильная группа (*NBh*)

N-Бензйлокискарбонил(4,4'-диметоксйбензгидрил)-*L*-глутеина [311]



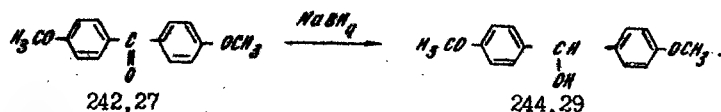
Методика 206. 4,4'-Диметоксйбензофенон [360]



107 г (0,63 моль) хлорангидрида анисовой кислоты смешивают в 750 мл сероуглерода с 72,3 мл (0,68 моль) анизола и 90 г (0,68 моль) безводного хлорида алюминия. Смесь сразу бурно закипает. Начинает выпадать хорошо кристаллизующийся желтый осадок, и происходит слабое выделение хлористого водорода. Реакционную смесь выдерживают ночь и на следующий день кипятят еще 3 ч, а затем разлагают смесью соляной кислоты со льдом и после стояния в течение нескольких часов отфильтровывают осадок, а маточный раствор выбрасывают. Осадок перекристаллизуют из пропилового спирта. Выход 135 г (88 %), т.пл. 143–144 °С.

Внимание! 1. Во время работы прибор должен быть хорошо защищен от влаги. 2. Работа с сероуглеродом сопряжена с опасностью. Сероуглерод является самым легковоспламеняющимся из всех растворителей, а также сильным ядом для нервной и кровеносной систем.

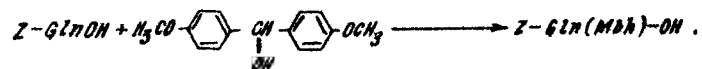
Методика 207. 4,4'-Диметоксйбензгидриловый спирт [311]



В раствор 96 г (0,4 моль) 4,4'-диметоксйбензофенона в 1,5 л 96 %-ного этанола при нагревании вносят 8 г *NaBH*₄, затем кипятят 2–3 ч с обратным холодильником, фильтруют и выливают фильтрат в 4 л воды. Осадок отфильтровывают, еще влажным растворяют в этилацетате,

сушат сульфатом натрия и растворитель удаляют в вакууме. Остаток затирают о петролейный эфиром и отфильтровывают кристаллы. Выход 76,8 г (75 %), т.пл. 72-73 °С.

М е т о д и к а 208. *N*-Бензилоксикарбонил(4,4'-диметоксисбензгидрил)-*L*-глутамин [311]



К раствору 28 г (0,1 моль) карбобензоксиглутамин и 24 г (0,1 моль) 4,4'-диметоксисбензгидрилового спирта в 250 мл уксусной кислоты добавляют при комнатной температуре 0,5 л концентрированной серной кислоты, выдерживают раствор в течение ночи при комнатной температуре и выливают в 750 мл воды. Выпадает масло, которое вскоре закристаллизовывается. Осадок отфильтровывают и переводят в этилацетат, органический слой после промывки водой сушат сульфатом натрия и удаляют этилацетат в вакууме. Остаток растирают с эфиром и отделяют кристаллы фильтрацией. После перекристаллизации их из смеси ТГФ - петролейный эфир выход составил 45,8 г (90 %), т.пл. 117-120 °С, $[\alpha]_D^{22} = -6,75^\circ$ (с=2, ДМФА).

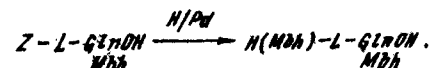
Аналогично из 27 г (0,1 моль) карбобензоксиглутамин в 300 мл уксусной кислоты получают 47,5 г (96 %) *N*-бензилоксикарбонил(4,4'-диметоксисбензгидрил)-*L*-аопарагина, т.пл. 176-180 °С, $[\alpha]_D^{25} = +2,43^\circ$ (с=2, ДМФА).

Условия удаления Mbh-группы. 4,4'-Диметоксисбензгидрильная группа легко удаляется трифторуксусной кислотой с анизолом при нагревании или при комнатной температуре, устойчива при каталитическом гидрогенолизе и щелочной обработке. Приводим условия удаления Mbh-группы [311]:

Кипящая трифторуксусная кислота	- 15 мин
Кипящая трифторуксусная кислота/анизол (10:1)	- 5 мин
Трифторуксусная кислота/анизол (10:1) при 22 °С	- 2-3 ч
Муравьиная кислота/анизол при 80 °С	- 1 ч

Как видим из приведенных данных, в присутствии Mbh-группы можно селективно удалять карбобензоксигруппу и бензильные эфиры гидрогенолизом, а также в мягких условиях также кислотолabile группы, как *Bros*, *Nps*, *Tgt* и некоторые другие. В то же время при удалении Mbh-группы одновременно удаляются *Bos*- и *Aos*-группы и расщепляются трет-бутильные эфиры.

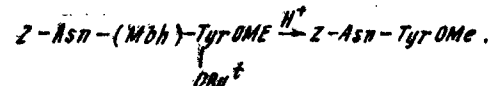
М е т о д и к а 209. 4,4'-Диметоксисбензгидрил-*L*-глутамин [311]



Гидрируют 5,2 г (10 ммоль) *N*-бензилоксикарбонил(4,4'-диметоксисбензгидрил)-*L*-глутамин в смеси уксусная кислота - метанол (1:1) до прекращения выделения CO₂. После фильтрации раствор упаривают в вакууме, остаток растирают с эфиром и образовавшийся осадок отфильтровывают. Выход 2,81 г (76 %), т.пл. 205-208 °С, $[\alpha]_D^{22} = +7,5^\circ$ (с=2, CH₃COOH).

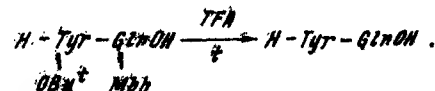
4,4'-Диметоксисбензгидрил-*L*-аопарагин получают аналогично. После перекристаллизации из воды выход составляет 59 %, т.пл. 226-230 °С, $[\alpha]_D^{22} = +9,75^\circ$ (с=29 CH₃COOH).

М е т о д и к а 210. Метилловый эфир бензилоксикарбонил(4,4'-диметоксисбензгидрил)-*L*-аопарагинил-(0-трет-бутил)-*L*-тирозина [311]



Раствор 1,45 г (2,02 ммоль) *Z-Asn(Mbh)-Tyr(OBu^t)OMe* в 10 мл трифторуксусной кислоты и 1 мл анизол выдерживают 2 ч при температуре 20 °С. Упаривают растворитель в вакууме при температуре бани 20 °С, остаток обрабатывают эфиром, отфильтровывают осадок и промывают его эфиром. Выход 846 мг (94 %), т.пл. 196-199 °С, $[\alpha]_D^{22} = +7,75^\circ$ (с=1, ДМФА).

М е т о д и к а 211. (0-трет-Бутил)-*L*-тирозил-(4,4'-диметоксисбензгидрил)-*L*-глутамин [311]



2 г *H-Tyr-Gln(Mbh)-OH* растворяют в 2 мл анизол и 20 мл трифтор-

уксусной кислоты и полученный раствор кипятят в течение 5 мин с обратным холодильником. Затем растворитель отгоняют в вакууме, остаток растворяют в воде, водный слой экстрагируют эфиром, а затем встряхивают с ионообменником "Леватит" ЖР-45 (в ацетатной форме) до достижения pH 4,0. После удаления смолы фильтрованием воду упаривают в вакууме. Выход 1 г (95 %).

Хорошо известно, что индолъное ядро триптофана в кислой среде весьма склонно к окислению. Для того чтобы избежать этого, при удалении защитных групп триптофаносодержащих пептидов трифторуксуюной кислотой добавляют в реакционную смесь 2 % меркаптоэтанола или дитиотреитола, а при обработке указанных пептидов безводным фтористым водородом используют для тех же целей анизол. Разрушение триптофана практически не идет при деблокировании каталитическим гидрогенолизом или при обработке триптофаносодержащих пептидов концентрированной муравьиной кислотой. Сузуки с ооавт. [361] показали, что удаление Вос-группы у триптофаносодержащих пептидов можно проводить 2 М раствором сульфоксилов, например п-толуолсульфокислотой, метансульфокислотой, этанолсульфокислотой в диоксане (или в уксусной кислоте) в присутствии 2 %-ных анизола и меркаптоэтанола при комнатной температуре в течение 20 мин без разложения триптофана.

Согласно работам М.Оно о соавт. [313], удаление Вос-группы триптофансодержащих пептидов можно осуществлять 0,1 н. *HCl* в муравьиной кислоте. В этих условиях формируется индольное ядро триптофана, что защищает его от дальнейших нежелательных превращений.

Методика 212. *N*¹⁷-Формил-*L*-триптофан [313]



Через раствор 7 г 4-триптофана в 100 мл муравьиной кислоты (98-100 %) при комнатной температуре пропускают ток сухого хлористого водорода. В определенные промежутки времени из реакционного сосуда отбирают аликвоту, разбавляют ее водой и записывают УФ-спектр. Когда поглощение при 298 нм достигнет максимального значения (на что требуется около 3 ч), растворитель удаляют в вакууме при слабом нагревании. К сиропообразному продукту добавляют эфир, и формилтриптофан кристаллизуется; его офильтровывают и промывают. Выход 9,2 г (100 %), т.пл. 218-220 °С, $[\alpha]_D^{25} = -4,7^\circ$ (с=1,9, вода).

Примечание. N^{α} -Формил- N^{10} -триптофан не флуоресцирует в ультрафиолете и не дает фислетовой окраски с реактивом Эрлиха.

К раствору 2,68 г (10 ммоль) хлоргидрата *N*ⁱⁿ-формил-*L*-триптофана в 60 мл ДМФА добавляют 4,2 г (30 ммоль) триэтиламина, а затем 3 мл Вос-азиды. Смесью перемешивают при комнатной температуре в течение 2 дней. Вначале образуется гелеобразная масса, которая по мере протекания реакции постепенно растворяется. Реакционную смесь выливают в 300 мл 0,5 М раствора лимонной кислоты и выпавшее масло экстрагируют 150 мл этилацетата. Органический слой промывают 4 раза водой, сушат сульфатом натрия, растворитель упаривают в вакууме при температуре 40 °С досуха. Сиропообразный остаток после разрастваривания в петролейном эфиром кристаллизуется; продукт отфильтровывают, промывают петролейным эфиром и сушат. Выход 2,9 г (89 %), т.пл. 102-104 °С, $[\alpha]_D^{25} = +22,3^{\circ}$ (с=1,6, этилацетат).

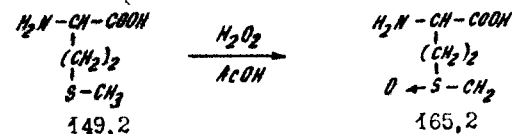
Методика 214. Удаление N^{in} -формильной группы
триптофана /313/

*N*ⁱⁿ-формильная группа триптофансодержащих пептидов легко отщепляется при обработке соответствующих соединений 0,1 М раствором пиперидина в воде или 0,1 М водным триэтиламино в течение 10 мин при температуре 0 °С с последующей лиофилизацией.

4.10. ЗАЩИТА БОКОВОЙ ГРУППЫ МЕТИОНИНА

В большинстве случаев синтез метионинсодержащих пептидов проводят без специальной защиты тиоэфирной группы метионина. Однако замечено, что при деблокировании Кбз-группы метионинсодержащих пептидов бромистым водородом в уксусной кислоте может происходить расщепление тиоэфирной связи с образованием *S*-бензилгомоцистеина. Для устранения этой побочной реакции предложено использовать вместо метионина в пептидном синтезе метионинсульфоксид. Производные метионинсульфоксида легко получают при окислении метионина (или соответствующих его производных) перекисью водорода в соляной или уксусной кислоте.

Методика 215. *L*-Метионин-*d*, *l*-сульфокоид [310]



Суспензию 1,49 г (10 ммоль) *L*-метионина обрабатывают в 30 мл уксусной кислоты при 10 °C 1,33 мл (12 ммоль) 30 %-ной H_2O_2 (9 н. раствором) при встряхивании, постепенно доводя температуру раствора до комнатной. Через 20 мин исходный материал растворяется, а через 60 мин реакция заканчивается (иодометрическая проба на присутствие H_2O_2). Раствор упаривают в вакууме при температуре не выше 40 °C и остаток перекристаллизовывают из смеси вода - ацетон. Выход 1,59 г (96 %), $[\alpha]_D^{25} = +37,2^\circ$ ($c=2,1$; 1 н. HCl).

Методика 216. *N*-Бензилоксикарбонил-*L*-метионин-*d*, *L*-сульфоксид [310]

К раствору 5 г (30 ммоль) *L*-метионин-сульфоксида в 7,5 мл 4 н. $NaOH$ добавляют при перемешивании и охлаждении до 5 °C по каплям одновременно 6 г (35 ммоль) карбобензоксиклорида и 7,5 мл 4 н. $NaOH$, поддерживая pH 8-9 (в течение около 15 мин). Затем перемешивают еще 30 мин при 5 °C и 30 мин при комнатной температуре, экстрагируют эфиром и подкисляют концентрированной HCl при 0 °C до pH 2. Выделившееся масло экстрагируют этилацетатом, промывают этилацетатный раствор водой до pH 7, сушат сульфатом магния и удаляют растворитель в вакууме. Остаток кристаллизуют из смеси этилацетат - эфир (0 °C). Выход 7,44 г (83 %), т.пл. 93-96 °C. Перекристаллизация из смеси ацетон - эфир дает продукт с т.пл. 104-106 °C, $[\alpha]_D^{25} = -16,0^\circ$ ($c=4,1$, этанол).

Удаление защитной группы метионина

Метионинсульфоксид легко восстанавливается в метионин восстанавливающими агентами: тигликолевой кислотой, меркаптоэтанолом, водородом над палладиевым катализатором, никелем Ренея, натрием в аммиаке и др. Лучше всего проводить восстановление тигликолевой кислотой.

Методика 217. Протил-тирозил-(*L*-тозил)-лизил-метионин [310]

Суспензию 354 мг (0,5 моль) *N*-*L*-Pro-*L*-Tyr-*L*-Lys(Trt)-*L*-MetOH $\beta \rightarrow O$

в 5 мл воды обрабатывают 0,3 мл (5 ммоль) свежеперегнанной тигликолевой кислоты в атмосфере азота при встряхивании в течение 20 ч при 50 °C (вначале прозрачный раствор постепенно выделяет продукт реакции в виде масла). После удаления растворителя в вакууме масля-

нистый остаток многократно затирают с эфиром и получившийся аморфный порошок растворяют в небольшом количестве метанола и добавляют в него 2,5 н. раствор аммиака в метаноле до слабощелочной реакции. Через 30 мин выпавшие кристаллы отфильтровывают, растирают с горячим метанолом, фильтруют и сушат. Выход 299 мг (86 %).

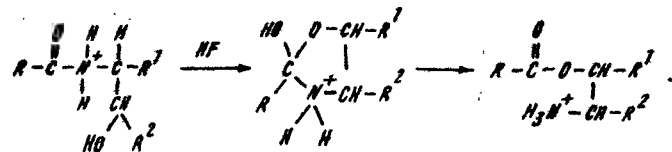
4.11. УДАЛЕНИЕ ЗАЩИТНЫХ ГРУПП БЕЗВОДНЫМ ФТОРИСТЫМ ВОДОРОДОМ

В 1965 г. Сакакибара и Шимониши [334] показали, что для деблокирования защищенных пептидов может быть успешно использован безводный фтористый водород. Для предотвращения полимеризации бензилфторидов добавляют анизол. В этих условиях гладко отщепляются следующие защитные группы: Кобз-группа, трет-бутилоксикарбонильная, нитрогруппа аргинина, тозилная, трет-бутильная, о-нитрофенилсульфенильная группа, защитные группировки бензильного типа и др. При этом метиловые, этиловые и п-нитробензиловые эфиры не гидролизуются. Ленард и Робинсон [335] в 1967 г. впервые применили безводный фтористый водород для деблокирования и отщепления от омола пептидов, синтезированных твердофазным методом.

Обычно отщепление защитных групп безводным фтористым водородом завершается при 0 °C за 60 мин. При твердофазном методе синтеза пептидов этот способ деблокирования стал основным. Установка для удаления защитных групп и отщепления пептидов от смолы описана в монографии Стюарта и Янг [8].

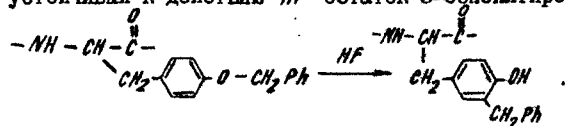
Как известно, HF является одной из сильнейших кислот и мощным катализатором ионных реакций; применение его может привести к различным побочным реакциям, о которых в последнее время накопилось довольно много экспериментальных данных. В обзорной работе Вольпиной с соавт. освещены результаты исследования разнообразных побочных процессов, протекающих при использовании безводного фтористого водорода [336]. Рассмотрим некоторые из них.

***N*→O-Ацильная миграция.** Пептиды, содержащие остатки серина и треонина, в присутствии HF претерпевают *N*→O-ацильную миграцию



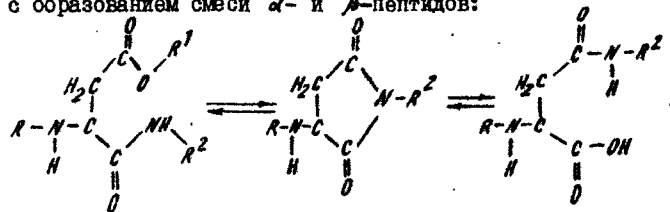
Изучали эту реакцию в условиях, при которых она идет с высоким выходом (12–24 ч, температура 20–30 °C); в обычных условиях деблокирования пептидов HF $\text{N} \rightarrow \text{O}$ -ацильная миграция незначительна. Кроме того, оказалось, что обработка пептидов раствором бикарбоната натрия количественно приводит к обратной $\text{O} \rightarrow \text{N}$ -миграции без скольконбудь заметной рацемизации.

Алкилирование тирозина. При отщеплении O -бензильной группы тирозина в результате реакции внутримолекулярного алкилирования образуется устойчивый к действию HF остаток 3-бензилтирозина:



Для устранения этого побочного процесса предложено блокировать тирозин более устойчивыми защитными группами, такими, как O -(2,6-дихлор)бензильная или O -циклогексильная группа.

Реакция транспептидации производных аспарагиновой кислоты. Бензильные эфиры аспарагиновой кислоты могут подвергаться транспептидации с образованием смеси α - и β -пептидов:



Для устранения этой побочной реакции предложено добавлять фенолы или 1-оксисбензотриазол; использование вместо бензильных эфиров соответствующих трет-бутиловых или циклогексильных производных также предотвращает указанный нежелательный процесс.

Алкилирование боковой цепи триптофана. Отщепление Boc -группы при помощи безводной HF сопровождается трет-бутилированием боковой цепи триптофана. Для защиты индольного ядра от этой побочной реакции необходимо добавлять тиоанизол, диметилсульфид и другие подобного типа реагенты.

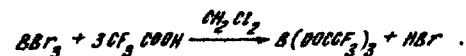
Наиболее надежным способом предотвращения указанного алкилирования является применение в синтезе N^{tr} -формилтриптофана, который неспособен трет-бутилироваться; кроме того, он устойчив в условиях окислительного разрушения триптофана.

Нежелательные процессы протекают также при отщеплении β -бензильной группы цистеина; в частности, имеет место неполное деблокирование защищенной сульфгидрильной группы.

Следует иметь в виду, что степень протекания указанных побочных реакций зависит от природы синтезируемого пептида. Однако во всех случаях использования безводного HF такие процессы могут иметь место, особенно при синтезе белков.

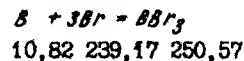
Использование трис-(трифторацетата) бора для удаления защитных групп. Для удаления защитных групп пептидов Плесо и Бауэр в 1973 г. [337] предложили вместо безводного фтористого водорода использовать три(трифторацетат) бора, применение которого имеет то преимущество, что с этим реагентом удобнее и безопаснее работать, чем с HF ; кроме того, при этом не нужна специальная аппаратура.

Реактив получают непосредственно перед использованием для удаления защитных групп по следующей схеме:



Раствор BTFA в трифторуксусной кислоте при температуре 0 °C отщепляет подобно безводному фтористому водороду Z^- , Boc^- , Tot^- , $(\text{Me})\text{Z}^-$, OBu^t , $-\text{NO}_2$, а также группы бензильного типа и многие другие. Этот способ удаления защитных групп успешно применяли для получения ряда биологически активных пептидов.

Методика 218. Трехбромистый бор [338]



Кварцевую трубку 4 (рис. 6) наполняют в пределах нагреваемой зоны рыхлым слоем аморфного бора и в нее помещают небольшое количество волокнистого тщательно высушенного асбеста, не заполняя всего сечения трубки, и продвигают асбест до зоны нагрева трубки.

Капельную воронку 1, кран и шлиф которой смазывают расплывшимся на воздухе P_2O_5 , наполняют бромом высшей чистоты, предварительно перегнанным над концентрированной серной кислотой. Перед нагреванием трубки весь воздух из установки вытесняют током сухого водорода, освобожденного от примесей кислорода. Продолжая пропускать водород, медленно нагревают бор до температуры 600 °C; при этом в течение длительного времени выделяется вода. Во время этого процесса высушивания приемник для трехбромистого бора не подсоединяют, а асбест во избежание поглощения влаги также слабо нагревают.

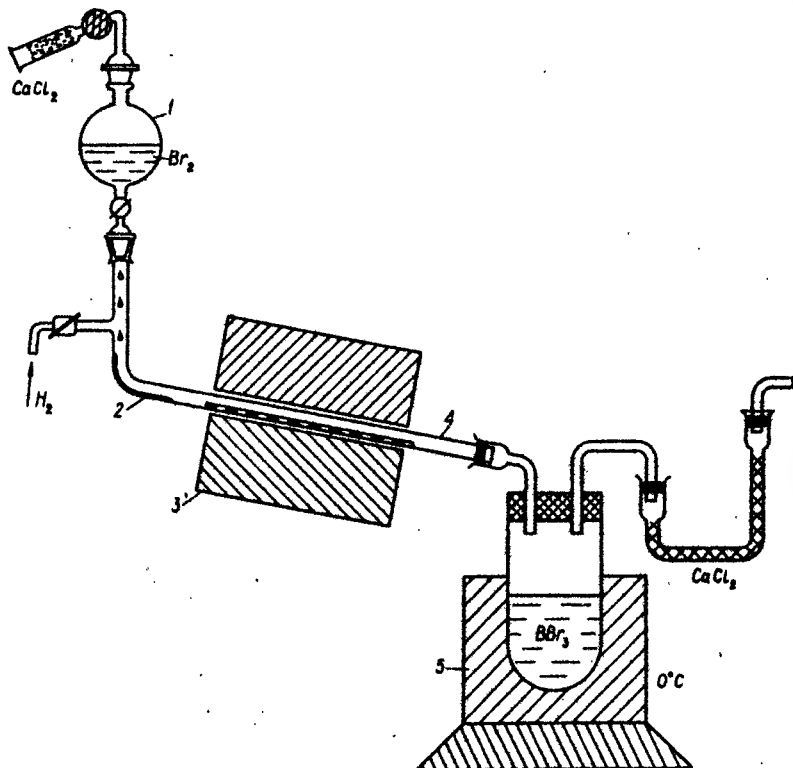
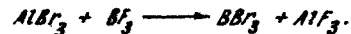


Рис. 6. Аппаратура для синтеза трибромистого бора:
1 - капельная воронка; 2 - асбест; 3 - нагревательная печь; 4 - кварцевая трубка; 5 - сосуд со льдом

Лишь после этого присоединяют приемник, температуру повышают до 700–750 °С, отключают подачу водорода и начинают прибавлять по каплям бром. Асбест диспергирует бром и способствует его равномерному растворению. Трибромистый бор, конденсирующийся в приемнике, должен быть бесцветным или слегка желтоватым. Для очистки его перегоняют без доступа воздуха над ртутью.

При загрузке 40–50 г бора удается получить в течение 2–3 ч около 500 г трибромистого бора (т. кип. 90,8 °С; $d = 2,65$). Продукт легко гидролизуется на воздухе, поэтому его хранят в запаянных ампулах.

Небольшое количество трибромистого бора можно получить с выходом 70 % по реакции



Этот синтез описан в сборнике [339].

Методика 219. Трио-(трифторацетат) бора [337]

Эквивалентные количества трехбромистого бора и трифторуксусной кислоты смешивают в хлористом метиле при температуре 0 °С; при этом образуется осадок. Реакционную смесь упаривают в вакууме при 20 °С досуха, а остаток растворяют в ТМВ и полученный раствор используют непосредственно для отщепления защитных групп.

Методика 220. Общая методика отщепления защитных групп о помощи ВТФА [337]

Навеску защищенного пептида растворяют в трифторуксусной кислоте и смешивают при температуре 0 °С по крайней мере с тремя эквивалентами трио-(трифторацетата) бора в трифторуксусной кислоте на каждую отщепляемую группу. Для удаления нитро-, тозилной или п-метоксибензильной групп используют от 5 до 6 эквивалентов реагента. Спустя 1 ч растворитель упаривают при 20 °С, а остаток обрабатывают обычным способом.

Соединения бора удаляют о помощью многократного добавления и последующего упаривания в вакууме метанола; от них можно освободиться также при хроматографической очистке пептида.

4.12. ОБЩАЯ СТРАТЕГИЯ ПРИМЕНЕНИЯ ЗАЩИТНЫХ ГРУПП

В заключение раздела о защитных группах (гл. 2–4) следует отметить, что (как и в большинстве монографий, освещавших синтез пептидов) основная часть нашего исследования посвящена защитным группам. В начале гл. 2 уже упоминалось о том, что большое число защитных групп, предложенных на сегодняшний день, вызвано необходимостью их селективного удаления в процессе синтеза. Однако поиск ведется и в направлении улучшения характеристик защитных групп (более мягкие условия удаления, подавление побочных реакций, их устойчивость при очистке и хранении пептидов и др.).

Именно большое число группировок для защиты реакционных групп позволяет выбрать наиболее гибкую тактику синтеза каждого конкретного полипептида.

Хотя набор существующих защитных групп позволил в течение по-

следних 20 лет достиг впечатляющих результатов (синтезированы пептиды, состоящие из 100 и более аминокислотных остатков), тем не менее проблема защитных групп остается актуальной. В статье, посвященной этой проблеме [340], Янг отмечает: "Я имею право утверждать, что трудности в синтезе в настоящее время больше обусловлены несовершенством защитных групп — частичное отщепление в процессе синтеза или неполное удаление в конце синтеза, — чем недостатком конденсирующих агентов (хотя они также нуждаются в усовершенствовании)".

Каким же требованиям должны удовлетворять "совершенные" защитные группы? В 1977 г. Барени и Меррифилд [341] предложили концепцию "ортогональной системы" в пептидном синтезе. Ортогональная система определяется как набор полностью независимых классов защитных групп. В этой системе каждый класс защитных групп может быть удален в присутствии всех других классов. Идеальной общей стратегией пептидного синтеза, по мнению авторов указанной работы, было бы использование по крайней мере трех классов защитных групп, удаление которых осуществлялось бы реакциями с различными механизмами. Схематически это изображено на рис. 7.

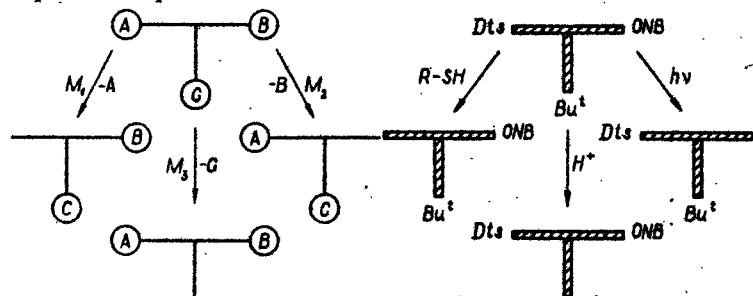


Рис. 7. Схема селективного удаления защитных групп ортогональной системы. А, В и С — три класса защитных групп для α -амино-, α -карбоксылной и боковых функциональных групп

Рис. 8. Пример использования некоторых классов защитных групп ортогональной системы в пептидном синтезе

В качестве примера ортогональной системы авторы работы [341] предлагают следующие три класса защитных групп: дитиосульфидную (Dts), удаляемую тиолизом; о-нитробензильную (ONB), удаляемую УФ-облучением; трет-бутильную (Bu^t), удаляемую ацидолизом, — для блокирования боковых функциональных групп (рис. 8).

Используя табл. 44, иллюстрирующую возможность селективного удаления защитных групп, можно легко построить подобные "триады" ортогональной системы.

По-видимому, ортогональная система защитных групп может находить применение в отдельных специальных случаях. Нам кажется, что для большинства схем пептидного синтеза она "избыточна", поскольку чаще всего нет необходимости селективного удаления всех трех классов защитных групп. В процессе синтеза пептидов обычно чаще всего приходится удалять N_α -защитные группы (ступенчатый синтез в растворе, твердофазный и жидкофазный синтезы), реже — защиту α -карбоксылной группы (блочный синтез пептидов). Защитные группировки боковых функциональных групп обычно удаляют на последней стадии синтеза, поэтому Хиршман [6] называет их "стабильными" группами в отличие от указанных выше "временных" защитных групп.

Проблема удаления защитных групп детально рассмотрена в обзоре О.М.Вольпиной с соавт. [336], где системы защитных группировок подразделяются по способам их удаления на конечной стадии синтеза на четыре группы.

1. Каталитическое гидрирование над палладием. Это очень мягкий способ деблокирования. Удаляются все защитные группы бензильного типа и некоторые другие (см. табл. 44). Данный метод не подходит для пептидов, содержащих цистеин и метионин.

2. Обработка трифторуксуюной кислотой. Один из самых мягких способов деблокирования. При его использовании выбирают для защиты боковых функций аминокислот защитные группы трет-бутильного типа (Boc , Ac , $Adac$, Bsu^t). В качестве N_α -защитной группы можно использовать Koz -группу (в случае отсутствия Cys и Met), а также более кислотолабильные ($Broc$, Ddz и др.) или щелочнолабильные группы ($Fmoc$ и др.).

3. Обработка безводным фтористым водородом при $0^\circ C$ в течение 1 ч. Этим путем удаляется большинство защитных групп. Может вызывать побочные реакции (см. раздел 4). Является стандартным методом деблокирования и отщепления от полимера в твердофазном синтезе.

4. Обработка натрием в жидком аммиаке. Удаляются многие защитные группы. Метод может приводить к глубокой деструкции пептидов, поэтому в настоящее время применяется редко.

Таким образом, наиболее распространенными схемами синтеза пептидов в настоящее время являются такие, где используют: 1) боковые защитные группы бензильного типа в сочетании с кислотолабильными N_α -защитными группами и 2) боковые защитные группы кислотолабильного типа с N_α -защитными группами бензильного или щелочнолабильного типа (например, $Fmoc$ -группы).

Следует остановиться на еще одной важной проблеме, обсуждавшейся в работе [336], — проблеме защитных групп при синтезе крупных по-

Т а б л и ц а 44. Возможность избирательного удаления зашитых

A \ B	Аминогруппа											Карбоксильная группа										
	Z	Boc	Broc	Nps	Tos	TFA	Fmoc	Z(OMe)	Adoc	i-Noc	NBoc	OMe	OBzl	OBu ^t	OBzOMe	OBzh	OPh	OTCl	OTMSe	OFmoc		
Аминогруппа	Z	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Boc	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Broc	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Nps	3	8	8	3/8	3/8	3/8	8	8	3/8	3/8	3/8	3/8	3/8	3/8	3/8	3	3	8	3/8		
	Tos	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	TFA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Fmoc	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Z(OMe)	2	6	6	-6	2/6	2/6	6	2	2	2	2	-	-	-	2	2	-	2	-	2	-
	Adoc	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	i-Noc	11	6/11	6/11	-6/11	6/11	6/11	11	11	6/11	6/11	6/11	6/11	6/11	6/11	6/11	6/11	6/11	6/11	6/11	6/11	6/11
Карбоксильная группа	NBoc	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	OMe	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	OBzl	4	6	6	4	6	6	6	4	6	4	4	6	6	6	4	6	4	6	6	6	6
	OBu ^t	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	OBzOMe	2	6	6	-2	2	2	-6	2	2	2	2	6	6	6	-2/6	2	2	2	2	2	2
	OBzh	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	OPh	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	OTCl	11	11	4	4	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	OTMSe	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	OFmoc	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

групп

Оксигруппы				Тиольная				Гуанидиновая				Имидазольная				Амин-ная		Способы удаления	
Bzl	Z	Bu ^t	ONB	Bzl	Bu ^t	NBz	PhS	NBz	(t) ₂	(NBz) ₂	Tos	NBS	Bzl	Boc	Tos	Dnp	BzH		NH
1	-	6	1	1	1	1	1	1	-	6	1/6	6	1	1	6	1/6	6	6	1,6,(7)
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	2,(1)
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3,(2,1)
3/8	3/8	3/8	3/8	3/8	3/8	3/8	3/8	3/8	3/8	3/8	3/8	3/8	3/8	3/8	3/8	3/8	3/8	3/8	3,8(2,1)
-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-				7 (12)
+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4 (NH ₄)
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5 (4)
2	2	-	2	2	2	2	2	2	-	2	2	2	2	-	2	2	-	-	2,6(1)
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	2 (1)
11	11	6	-	11	11	11	-	-	11	6	6/11	11	11	6/11	6/11	11	6	6	11, 6
+	-	+	-	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	10 (6)
+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4
4	-	6	4	4	4	4	4	4	4	6	6	6	4	6	6	4	6	6	6,4(7)
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	2 (1)
2	2	6	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	6	2	2	6	6	2, 6
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	2 (1)
+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4+H ₂ O ₂
11	11	11	4	11	11	11	11	4	11	11	11	11	11	11	11	4	11	11	11, 4
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NBz ⁺ F ⁻
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5, 4

Б А		Аминогруппа										Карбоксильная группа									
		Z	Boc	Boc	Mps	Tos	TFA	Fmoc	Z(OMe)	Adoc	1-Adoc	NBoc	OMe	OBzL	OMe ⁺	OBzL(OMe)	OBzLh	OMe	ZALO	OMe ⁺	OMe ⁺
Оксигруппы	BzL	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-
	Z	4	6	4	4	4	6	6	-	4	4	-	6	-	6	-	-	6	-	6	-
	Bu ⁺	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
	oNB	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+		+	+	+	+
Тиольная	BzL	-	+	+	+	-	-	-	-			-	+		+	-		+	-		-
	Bom (AcM)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Bu ⁺	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-		-	-	+
	pNB	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
Гуанидиновая	NO ₂	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-
	(Z) ₂	-	6	6	-	1	1	1	-	6	1	-	1	1	6	-	-	1	6	1	1
	(Adoc) ₂	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-		+	+	+	+
	Tos	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-		+
	MBS	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+		-
Имидазольная	BzL	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-
	Boc	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
	Tos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Dnp	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Амидная	Bzh	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
MDh		+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+

Оксигруппы				Тиольная				Гуанидиновая				Имидазольная				Амидная		Способы удаления	
BzI	Z	Bu ^t	ONB	BzI	Bom (AcM)	Bu ^t	ONB	NO ₂	(Z) ₂	(Adoc) ₂	Tos	MBS	BzI	Boc	Tos	Dnp	Bzh		Nbh
	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	6, (7)
4		4/6	4	4	4	4	4	4	4	4	4/6	4	4	4/6	4/6	4	6	6	4, 6
+	+		+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	2, (1)
+	+	+		+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	10, (6)
-	-	+	-		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+				7, (12)
+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
-	-	-	-	-	+		-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	12 (№3-5)
-	-	+	-	-	-	-		-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	6
-	-	+	-	-	-	-			+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	6, (12)
1	-	6	1	1	1	-	-	1		6	1/6	6	1	6	1/6	1	6	6	1, 6
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	-	+	+	-	-	2
-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-		-	-	-	-	+	-	-	12
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+		+	-	+	+	-	-	CH ₃ SO ₂ H, (12)
-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		-	+	-	+	+	6
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-		+	+	-	-	2
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	13, 14
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	R-SH
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+		-	2
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-		2

липептидов и белков. В уже упоминавшейся выше работе [340] отмечается, что с ростом длины полипептидной цепи сильно возрастают требования как к стабильности защитных групп, так и к полноте их отщепления. Известно, что неполное удаление *Boc*-группы при твердофазном синтезе приводит к появлению ошибочных последовательностей.

Другой проблемой, возникшей при синтезе крупных пептидов, является неустойчивость некоторых защитных групп при многократном деблокировании α -аминогруппы кислотными реагентами. Например, при обработке пептидов в условиях твердофазного синтеза трифторуксусной кислотой в хлористом метиле (33-50 %-ный раствор) частично отщепляются некоторые защитные группы бензильного типа (*Lys*(*Z*), *Tyr*(*Bzl*), *Tyr*(*Z*), *Cys*(*MBzl*)). С целью устранения этого нежелательного процесса используют другие защитные группы для этих аминокислот (*Lys*(*3ClZ*), *Lys*(*2,6Cl₂Z*), *Lys*(*Tfa*), *Tyr*(*BzlCl₂*), *Cys*(*4CH₂Bzl*)). Кроме того, перспективным является использование вместо кислотолабильных N_α -защитных групп *Fmoc*-группы, которая снимается основаниями в очень мягких условиях.

При планировании синтеза пептидов важное значение имеет правильный выбор системы защитных групп. Здесь получили распространение две стратегии - минимальной и максимальной защиты.

Хиршман и Вебер [6] указывают на ряд преимуществ тактики минимальной защиты: отсутствие некоторых побочных реакций защитных групп, ухудшение растворимости крупных, полностью защищенных пептидов в полярных растворителях; возможность промежуточной очистки пептидов с минимальным числом защитных групп в водно-органических средах. Вместе с тем они признают определенные недостатки тактики минимальной защиты - возможность побочных реакций некоторых незащищенных функциональных групп, что ограничивает выбор конденсирующих агентов. Они считают, что необходимо защищать только такие сильные нуклеофильные группы, как ϵ -аминогруппа лизина и тиольная группа цистеина.

По мнению авторов обзора [336], тактика максимальной защиты боковых функций аминокислот (особенно при синтезе крупных пептидов и белков) хотя и усложняет синтез, но обладает рядом ценных преимуществ - улучшение растворимости пептидов и ограничение возможности побочных реакций. Синтез α -бунгаротоксина [272] и ряда других крупных пептидов является хорошим подтверждением этого.

Правила пользования табл. 44.

В горизонтальных и вертикальных колонках таблицы (А и Б) приведены основные защитные группы, используемые в настоящее время. При

определении возможности селективного удаления защитной группы колонки А в присутствии защитных групп колонки Б следует найти квадрат, где эти колонки пересекаются. Если селективное удаление возможно, это обозначается знаком "+", цифрами - метод деблокирования. Если селективное удаление невозможно, в квадрате ставится знак "-", а если соответствующий квадрат пустой, это означает, что данных по селективному удалению защитной группы нет. В последней вертикальной графе обозначены цифрами все возможные методы удаления данной защитной группы. Способы деблокирования обозначены цифрами: 1 - сильные кислоты; 2 - кислоты средней силы; 3 - слабые кислоты; 4 - сильные основания (щелочи); 5 - амины; 6 - каталитический гидрогенолиз; 7 - натрий в жидком аммиаке; 8 - тиолы; 9 - Hg^{++} ; 10 - УФ-облучение; 11 - цинк в уксусной кислоте; 12 - жидкий фтористый водород.

Пример. Можно ли удалить бензилоксикарбонильную группу в присутствии *Boc*-группы? Можно реагентом 6 (каталитическим гидрогенолизом), но не ацидолизом (1), натрием в жидком аммиаке (7) или фтористым водородом (12).

ПРИМЕРЫ СИНТЕЗА НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ

Метининэнкефалин *Tyr-Gly-Gly-Phe-Met*

Сс времени открытия эндогенных опиоидных пептидов лейцинэнкефалина и метининэнкефалина Хьюгесом с соавт. [342] было предложено большое количество синтетических приемов для получения этих пептидов и ряда их аналогов. Приемы эти отличались схемой синтеза и выбором как отдельных защитных групп, так и способов их удаления.

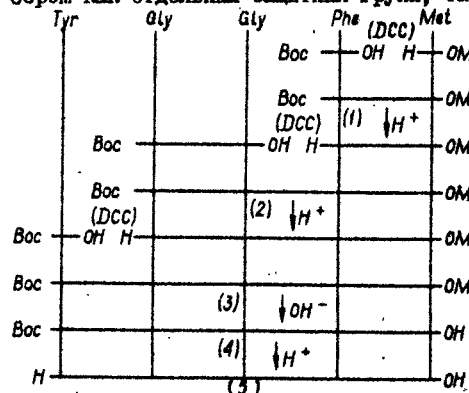


Рис. 9. Схема синтеза метининэнкефалина [343]

с использованием мягких конденсирующих агентов, таких, как ДПТК или активированные эфиры. В качестве эффективного метода сшивки применяли также ДПТК с добавкой 1-оксобензотриазола.

Схема, изображенная на рис. 9, позволяет получить свободный пептид с общим выходом 57 % (из расчета на исходный метиловый эфир метинина) из метилового эфира Бок-метионинэнкефалина после его омыления с помощью 0,25 н. NaOH и отщепления Бок-группы.

Экспериментальная часть

Значения $[\alpha]_D^{25}$ определяли с точностью до $\pm 0,5^\circ$. ТСХ проводили на пластинках "Силуфол" (ЧССР), для хроматографии использовали следующие системы растворителей: а) н. бутанол - уксусная кислота - вода (4:1:1); б) н. пропанол - 20 %-ный водный аммиак (7:3).

Метиловый эфир трет-бутилоксикарбонилглицил-глицил-фенилаланил-метионина [343]. Защищенный пентапептид (2) получен конденсацией дипептида - Бок-глицилглицина и деблокированного дипептида (1) - метилового эфира Бок-фенилаланил-метионина, описанного в литературе ранее [344]. Защищенный дипептид (1) получали карбодимидным методом путем сочетания Бок-фенилаланина и хлоргидрата метилового эфира метинина. Для защищенного дипептида: т.пл. 84-85 °С, $[\alpha]_D^{25} = -20,7^\circ$ (с=1, метанол) [344]. Деблокирование производили 1 н. HCl в дioxane. Для деблокированного дипептида - хлоргидрата метилового эфира фенилаланил-метионина т.пл. 120 °С, $[\alpha]_D^{25} = -4,5^\circ$ (с=0,85, метанол).

Растворили 3,11 г (10 ммоль) хлоргидрата метилового эфира фенилаланил-метионина в 20 мл ДМФА, смешивали с 1,1 мл (10 ммоль) N-метилморфолина и при -10 °С добавляли 3,84 г (15 ммоль) Бок-глицилглицина, 3,09 г (15 ммоль) ДПТК, 2,03 г (15 ммоль) 1-оксобензотриазола в 20 мл ДМФА и оставляли на 4 ч при -10 °С, 4 ч при 0 °С и затем на 10 ч при 20 °С. Отфильтровывали дициклогексимочевину, растворитель удаляли в вакууме, остаток растворяли в этилацетате и промывали 1 н. раствором NaHCO₃, 5 %-ным раствором бисульфата калия и сушили над сульфатом магния. После фильтрации маточный раствор удаляли в вакууме и остаток кристаллизовали из смеси этилацетат - петролейный эфир. Выход 4,37 г (83,5 %), т.пл. 100-105 °С, $[\alpha]_D^{25} = -23,3^\circ$ (с=1, метанол), $n_D^{20} = 0,77$ (б).

Хлоргидрат метилового эфира глицил-глицил-фенилаланил-метионина [343]. 4 г (7,63 ммоль) дипептида (2) выдерживали в 40 мл 4 н. HCl в дioxane в течение 30 мин при 20 °С, растворитель удаляли в вакууме, а продукт кристаллизовали из смеси метанол - эфир. Выход 3,41 г (97 %), т.пл. 183-187 °С, $[\alpha]_D^{25} = -18,0^\circ$ (с=1, метанол), $n_D^{20} = 0,33$ (а).

Метиловый эфир трет-бутилоксикарбонилтирозинил-глицил-глицил-фенилаланил-метионина [343]. 3,23 г (7 ммоль) деблокированного пептида (2) растворяли в 20 мл ДМФА, смешивали с 0,77 мл (7 ммоль) N-метилморфолина и затем добавляли при -15 °С 2,81 г (10 ммоль) Бок-тирозина, 2,06 г (10 ммоль) ДПТК, 1,35 г (10 ммоль) 1-оксобензотриазола в 20 мл ДМФА и оставляли на 4 ч при -15 °С, затем на 6 ч при 0 °С и еще на 15 ч при 20 °С. После отфильтровывания дициклогексимочевину растворитель удаляли в вакууме, продукт переводили в этилацетат и хорошо промывали раствором 1 н. NaHCO₃, 5 %-ным раствором бисульфата калия и водой, сушили над сульфатом магния. Этилацетат удаляли на ротационном испарителе, а

тид ($R_f = 0,77$) обработали 4 мл 8 н. HCl в диоксане в течение 10 мин, после чего раствор разбавили сухим эфиром и упарили. Деблокированный дипептид растворяли в 10 мл хлороформа и добавляли к нему 2,34 г (4 ммоль) пентафторфенилового эфира N -динитрофенил- N' -БОК-гистидина и 0,56 мл триэтиламина (здесь и в дальнейшем добавляем триэтиламин до pH раствора 8,0), перемешиваем 30 мин и добавляем 0,44 мл (4 ммоль) N,N -диметиламиноэтиламина. Через 5 мин реакционную смесь промывали последовательно раствором 10 %-ной лимонной кислоты, 1 н. HCl , водой и 5 %-ным $NaHCO_3$. После сушки и упаривания растворителя защищенный трипептид ($R_f = 0,61$) обрабатывали 4 мл 8 н. HCl в диоксане в течение 10 мин. Свободный трипептид ($R_f = 0,33$) осаждали сухим эфиром, фильтровали, осадок растворяли в 10 мл хлороформа и 5 мл ДМФА. Доводили триэтиламином до pH 8,0 и прибавляли 1,58 г (4 ммоль) пентафторфенилового эфира БОК-изолейцина. Через 20 мин растворитель удаляли в вакууме, а остаток растворяли в 20 мл этилацетата и промывали 10 %-ной лимонной кислотой и водой. После сушки и упаривания защищенный тетрапептид был выделен после обработки остатка смесью гексан - эфир (9:1), обработан 4 мл 8 н. HCl в диоксане. Свободный тетрапептид ($R_f = 0,45$) осаждали сухим эфиром, фильтровали, а затем растворяли в 10 мл хлороформа и 5 мл ДМФА. Доводили pH до 8,0 триэтиламином и добавляли 1,66 г (3 ммоль) пентафторфенилового эфира О-бензил-тирозина, перемешивали 15 мин и вносили 0,22 мл N,N -диметиламиноэтиламина. Через 5 мин раствор упаривали, остаток растворяли в этилацетате и промывали обычным образом, как указано выше. После сушки и выпаривания получали защищенный пентапептид ($R_f = 0,70$), который обрабатывали без выделения 4 мл 8 н. HCl в диоксане. Свободный пентапептид ($R_f = 0,75$) через 10 мин осаждали сухим эфиром, отделяли фильтрацией, растворяли в 20 мл ДМФА и доводили до pH 8,0 триэтиламином. Добавляли 2,3 г (6 ммоль) пентафторфенилового эфира БОК-валина, через 20 мин растворитель удаляли, остаток переносили в этилацетат, промывали обычным образом и после сушки и упаривания выделяли защищенный гексапептид путем обработки остатка сухим эфиром ($R_f = 0,64$). После обработки его 4 мл 8 н. HCl в диоксане в течение 10 мин свободный гексапептид ($R_f = 0,67$) осаждали сухим эфиром, отделяли фильтрованием и растворяли в 10 мл хлороформа и 5 мл ДМФА. После доведения pH до 8,0 добавляли 2,9 г (6 ммоль) пентафторфенилового эфира ω -нитроаргинина, через 20 мин растворитель удаляли в вакууме, остаток переносили в хлороформ и раствор промывали обычным образом.

После удаления растворителя защищенный гептапептид ($R_f = 0,50$) изолировали путем обработки остатка 20 мл смеси этилацетат - эфир

(1:2). Гептапептид деблокировали путем обработки 6 мл 8 н. HCl в диоксане и свободный гептапептид ($R_f = 0,45$) изолировали обычным путем.

На конечной стадии гептапептид растворяли в 20 мл ДМФА, доводили pH до 8 и вносили в раствор 1,048 г (4 ммоль) пентафторфенилового эфира β -бензилового эфира карбообензоксинаспарагиновой кислоты. Через 15 мин растворитель заменяли хлороформом, раствор промывали обычным образом и после упарки гелеобразную массу растворяли в 25 мл горячего спирта. После охлаждения раствора отфильтровывали защищенный октапептид ($R_f = 0,60$) и после промывки его этанолом получали 1,8 г (53 % из расчета на пентафторфениловый эфир БОК-пролина), т.пл. 174-178 °C, $[\alpha]_D^{22} = -15,8^\circ$ ($c=0,5$, ДМФА).

Как видно из приведенной выше методики, высокие выходы на каждой стадии достигались следующим путем: на первой стадии брался двойной избыток дешевого аминокс компонента, который легко удалялся кислотной промывкой. На всех последующих стадиях использовали большой избыток активированных эфиров (4-6-кратный), который переводился в растворимое в кислоте производное после обработки N,N -диметиламиноэтиламином.

Защищенный октапептид деблокировали следующим образом: 0,517 г (0,3 ммоль) октапептида растворяли в 3 мл ДМФА и 0,86 мл 2-меркаптоэтанола. После выдержки при комнатной температуре в течение 15 мин частично деблокированный октапептид осаждали эфиром, фильтровали и промывали этанолом. Выход 0,45 г (97 %), $R_f = 0,13$; $R_f' = 0,44$. Другие защитные группы удаляли одновременно каталитическим гидрированием над 0,4 г 10 %-ного палладия на угле в смеси метанол - уксусная кислота - вода (5:1:1), контролируя процесс ТСХ. После удаления катализатора фильтрацией и упарки растворителя остаток растворяли в 2 мл воды и разбавляли 20 мл спирта. После стояния в течение ночи при 0 °C свободный октапептид отфильтровывали и промывали этанолом. Выход 0,21 г (70 %), $R_f = 0,18$; $R_f' = 0,29$, $[\alpha]_D^{22} = -64,5^\circ$ ($c=0,5$, 1 н. HCl).

4. Гринштейн Дж., Виниц М. Химия аминокислот и пептидов. - М.: Мир, 1967. - 821 с.
2. Шредер Э., Любе К. Пептиды. - М.: Мир, 1967. - Т. 1.
3. Шредер Э., Любе К. Пептиды. - М.: Мир, 1969. - Т. 2.
4. Пептиды: Основ. методы образования пептид. связей / Под ред. Э.Гросса, И.Майенхофера. - М.: Мир, 1983. - 421 с.
5. Химия биологически активных природных соединений / Под ред. Н.А.Преображенского, Р.П.Евстафьевой. - М.: Химия, 1970. - 512 с.
6. Химия полипептидов / Под ред. П.Католяниова. - М.: Химия, 1977. - 462 с.
7. Защитные группы в органической химии / Под ред. Дж.МакОмми. - М.: Мир, 1976. - 391 с.
8. Стюарт Дж., Янг Дж. Твердофазный синтез пептидов. - М.: Мир, 1971. - 176 с.
9. Митин Ю.В., Запелова Н.П. Методы синтеза пептидов // Успехи химии. - 1977. - 46, № 5. - С. 852-877.
10. Альбертоон Н.Ф. Синтез пептидов с помощью омешанных ангидридов // Орган. реакции. - 1965. - 12. - С. 174-379.
11. Буров С.В., Смирнова М.П. Защита аминокислот в пептидном синтезе // Успехи химии. - 1982. - 51, № 9. - С. 1567-1578.
12. Finn F.M., Hoffmann K. The synthesis of peptides by solution methods with emphasis on peptide hormones // The proteins / Eds H.Neurath, R.L.Hill. - New York: Acad. press, 1976. - Vol. 2. - P. 105-253.
13. Wünsch E. Synthese von Peptiden. - Stuttgart: Thieme, 1974. - 1005 S. - Methoden der Organischen Chemie / Herausgegeben von E.Müller; Bd XV(1).
14. Sheehan J.C., Hess G.P. A new method of forming peptide bonds // J. Amer. Chem. Soc. - 1955. - 77, N 4. - P. 1067-1068.
15. Sheehan J.C., Hlavka J.J. The use of water-soluble and basic carbodiimides in peptide synthesis // J. Org. Chem. - 1956. - 21, N 4. - P. 439-441.
16. Stevens C.L., Munk M.E. Nitrogen analogs of ketenes. 5. Formation of the peptide bond // J. Amer. Chem. Soc. - 1958. - 80, N 15. - P. 4069-4071.
17. Arens J.F. The chemistry of acetylenic ethers. 8. Acetylenic ethers as reagents for the preparation of amides // Rec. Trav. Chim. - 1955. - 74, N 6. - P. 769-770.
18. Gais H.J. 4-Dimethylamino-3-butyne-2-one as activating agent for peptide synthesis // Angew. Chem. Int. Ed. - 1978. - 17, N 8. - P. 597-598.
19. Neuenschwander H., Fahrni H.-P., Lienhard U. "Push-Pull"-Acetylene als Hilfsmittel zur Synthese von Peptiden // Helv. chim. acta. - 1978. - 61, N 7. - S. 2437-2451.
20. Loose G., Jeddige H. Neue Möglichkeiten zur Knüpfung der Peptidbindung // Liebigs Ann. Chem. - 1960. - 626. - S. 144-149.
21. Woodward R.B., Olcson R.A., Mayer H. A new synthesis of peptides // J. Amer. Chem. Soc. - 1961. - 83, N 4. - P. 1010-1012.
22. Hegarty A.F., McCarthy D.G. Peptide synthesis using unprotected amino acids and novel imidic acid reagents // Ibid. - 1980. - 102, N 13. - P. 4537-4538.
23. Bergmann M., Zervas L., Fruton J.S. On proteolytic enzymes. 11. The specificity of the enzyme papain peptidase I // J. Biol. Chem. - 1936. - 115, N 3. - P. 593-611.
24. Honsl J., Rudinger J. Nitrosyl chloride and butyl nitrite as reagents in peptide synthesis by the azide method // Collect. Czech. Chem. Commun. - 1961. - 26, N 9. - P. 2333-2334.
25. Wieland T., Bernhard H. Über peptid-synthesen. Mitt. 3. Die verwendung von anhydriden aus N-acylierten Aminosäuren und Derivaten anorganischer Säuren // Liebigs Ann. Chem. - 1951. - 572, N 3. - S. 190-194.
26. Belleau B., Malek G. A new convenient reagent for peptide synthesis // J. Amer. Chem. Soc. - 1968. - 90, N 6. - P. 1651-1652.
27. Diethyl phosphorobromidate - an effective new peptide-forming agent / A.Gorecka, M.Leplawy, J.Zabrooky, A.Zwierak // Synthesis. - 1978, N 6. - P. 474-476.
28. A new reagent for activating carboxyl groups; preparation and reactions of N,N-Bis(2-oxo-3-oxazolidinyl) phosphorodiamidic chloride / J.Diago-Meseguer, A.L.Palomo-Coll, J.R.Fernandez-Lisarbe, A.Zugara-Bilbao // Ibid. - 1980, N 7. - P. 547-551.
29. Synthesis of peptides derived from alpha-methylalanine / M.T.Leplawy, D.S.Jones, G.W.Kenner, R.C.Shppard // Tetrahedron. - 1960. - 11, N 1. - P. 39-51.
30. Studies on the total synthesis of an enzyme. 1. Objective and strategy / R.G.Dankewalter, D.F.Veber, F.W.Holly, R.Hirschmann // J. Amer. Chem. Soc. - 1969. - 91, N 2. - P. 502-503.
31. Schüssler H., Zahn H. Beitrag zur Reaktionsweise von Carboxy-aminosäuren mit Dicyclohexylcarbodiimid // Chem. Ber. - 1962. - 95, N 5. - S. 1076-1080.
32. Paul R., Anderson G.W. N,N'-Carbonyldiimidazole a new peptide forming reagent // J. Amer. Chem. Soc. - 1960. - 82, N 17. - P. 4596-4600.
33. Über aktivierte Ester. 2. Synthese aktivierter Ester von Aminosäure-Derivaten / R.Schwyzler, M.Feurer, B.Iselin, H.Kägi // Helv. chim. acta. - 1955. - 38, N 1. - S. 80-83.
34. Wieland T., Schäfer W., Bockelmann E. Über Peptidsynthesen. 5. Über eine bequeme Darstellungweise von Acylthiophenolen und ihre Verwendung zu Amid- und Peptid-Synthesen // Liebigs Ann. Chem. - 1951. - 572. - S. 99-104.
35. Jakubke H.-D., Voigt A. Untersuchungen über die peptidchemische Verwendbarkeit von Acylaminosäure-chinolyl-(8)-estern // Chem. Ber. - 1966. - 99, N 8. - S. 2419-2429.
36. Taschner E., Rzesutarska E., Lubiewska L. Darstellung aktiver Pyridyl-(3)-ester N-geschützter Aminosäuren und Peptide sowie deren Anwendung zur Peptid-Synthese // Liebigs Ann. Chem. - 1965. - 690. - S. 177-181.
37. Loose G., Barth A., Schatz K. N-Geschützte Aminoacyloxime als neue Carboxyl-aktivierte Verbindungen zur Peptid-Synthese // Ibid. - 1964. - 678. - S. 185-190.
38. Nefkens G.H.L., Tesser G.L. A novel activated esters in peptide syntheses // J. Amer. Chem. Soc. - 1961. - 83, N 5. - P. 1263.
39. Anderson G.W., Zimmerman J.E., Callahan F.M. N-Hydroxysuccinimide esters in peptide synthesis // Ibid. - 1963. - 85, N 19. - P. 3039.
40. König W., Geiger R. Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden; Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazolen // Chem. Ber. - 1970. - 103, N 3. - S. 788-798.
41. Sakakibara S., Jnukai N. The trifluoroacetate method of peptide synthesis. 1. The synthesis and use of trifluoroacetate reagents // Bull. Chem. Soc. Jap. - 1965. - 38, N 1. - P. 1979-1984.
42. Fujino M., Hatanaka Ch. A new procedure for the pentachlorophenylolation of N-protected amino acids // Chem. Pharm. Bull. - 1968. - 16, N 5. - P. 929-932.

43. Гудков А.Т., Шехватова Т.В. Синтез пентафторофенильных эфиров аминокислот и пептидов с использованием пентафторофенилтрихлор-ацетат // Журн. общ. химии. - 1978. - 48, № 9. - С. 2146.
44. Devadas B., Pandey R., Mathur K. Synthesis of peptides with 1- β -naphthalenesulphonyloxybenzotriazole - a highly efficient peptide coupling reagent // Ind. J. Chem. - 1979. - B16, № 11. - P. 1026-1027.
45. Lewis acids, especially zinc chloride: a new type of carbodiimide additive in peptide synthesis / H.D. Jakubke, Ch. Kleben, E. Berger, K. Neubert // Tetrahedron Lett. - 1978. - N 17. - P. 1497-1500.
46. Curtius Th. Synthetische Versuche mit Hippurazid // Chem. Ber. - 1902. - 35, N 3. - S. 3226-3228.
47. Pat. 1918549 USA, IC³ C 07, A 61 k. Peptide synthesis by N-hydroxy-succinimide esters / H. Joshua, R.F. Hirschmann, W.I. Paleveda. - Publ. 30.10.69.
48. Коломийцева Л.А., Кравцов В.Ф., Швачкин Ю.И. Природные пептиды и их аналоги // Журн. общ. химии. - 1976. - 46, № 5. - С. 1176-1181.
49. Boissonnas R.A. Une nouvelle méthode de synthèse peptidique // Helv. chim. acta. - 1951. - 34, N 104. - P. 874-879.
50. Vaughan J.R., Osato R.L. The preparation of peptides using mixed carbonic-carboxylic acid anhydrides // J. Amer. Chem. Soc. - 1952. - 74, N 3. - P. 676-678.
51. Shiori T., Yamada Sh. Amino acids and peptides. 4. Diphenyl phosphoroazide. A new convenient reagent for the peptide synthesis // Chem. Pharm. Bull. - 1974. - 22, N 4. - P. 849-854.
52. Shiori T., Yamada Sh. Amino acids and peptides. 5. On the mechanism for the peptide synthesis by diphenyl phosphoroazide // Ibid. - P. 855-858.
53. Shiori T., Yamada Sh. Amino acids and peptides. 6. Application of diphenyl phosphoroazide to the synthesis of peptides containing various functions // Ibid. - P. 859-863.
54. Amino acids and peptides. 15. Application of diphenyl phosphoroazide (DPPA) and diethyl phosphorocyanidate (DEPC) to the synthesis of the N-terminal decapeptide of Gastric inhibitory polypeptide / Y. Hamada, S. Rishi, T. Shiori, Sh. Yamada // Ibid. - 1977. - 25, N 2. - P. 224-230.
55. Tilak M.A. New nonsolidphase method for quick, quantitative synthesis of analytically pure peptides without intermediate or final purification // Tetrahedron Lett. - 1970. - N 11. - P. 849-854.
56. Kiso Y., Kai Y., Yajima H. N-Isobutoxy-carbonyl-2-alkoxy-1,2-dihydroquinoline derivatives, as coupling reagents in peptide synthesis // Chem. Pharm. Bull. - 1973. - 21, N 11. - P. 2507-2510.
57. Taschner E., Smulokowski M., Lubiewska-Makonieczna L. Racemisierungsfreie Synthese von Peptiden mittels Säurechloriden // Liebigs Ann. Chem. - 1970. - 239. - S. 228-230.
58. Использование пивалоилхлорида в синтезе пептидов, содержащих незамещенные аминокислоты / В.И. Унковский, Г.А. Васильева, Р.П. Евстигнеева, М.А. Кулиш // Журн. общ. химии. - 1983. - 53, № 1. - С. 216-221.
59. Sokolowska T., Kupryszewski G., Taschner E. Nova metoda syntezu peptydow poprzez symetryczne basowodniki N-chronionych aminokwasow // Roczn. - Chem. - 1958. - 32. - S. 813-819.
60. Weygand G., Klinke P., Eigen I. N-Trifluoroacetyl-L-Asparaginsäure-anhydrid und N-trifluoroacetyl-L-prolin-anhydrid // Chem. Ber. - 1957. - 90, N 6. - S. 1896-1905.
61. Benoiton N.L., Chen F.M.F. Peptide synthesis in partially symmetrical anhydrides of N-alkoxycarbonylamino acids in aqueous N,N-dimethylformamide // FEBS Lett. - 1981. - 125, N 1. - P. 104-106.
62. Leuchs H. Ueber die Glycin-carbonsäure // Chem. Ber. - 1906. - 39, N 1. - S. 857-861.
63. Katchalski E. Poly- α -amino acids // Adv. Protein Chem. - 1951. - 6. - P. 123-185.
64. The controlled synthesis of peptides in aqueous medium. 3. Use of Leuchs's anhydrides in the synthesis of dipeptides / R. Hirschmann, R.G. Strachan, H. Schwan et al. // J. Org. Chem. - 1967. - 32, N 11. - P. 3415-3425.
65. Kircher K., Berndt H., Zahn H. Peptidsynthese mit N-Carboxy- α -amino-säureanhydriden // Liebigs Ann. Chem. - 1980. - N 2. - S. 275-284.
66. Katakai R. Peptide synthesis using o-nitrophenylsulfenyl N-carboxy α -amino acid anhydrides // J. Org. Chem. - 1975. - 40, N 19. - P. 2697-2702.
67. Wieland Th., Vogeler K. Verwendung von Thionyl-diimidazol zur Peptidsynthese // Angew. Chem. - 1961. - 73, N 12. - S. 435.
68. Bodanszky M. Synthesis of peptides by aminolysis of nitrophenyl esters // Nature. - 1955. - 175, N 4459. - P. 685.
69. Synthesis of secretin. 2. The stepwise approach / M. Bodanszky, M.A. Ondetty, S.D. Levine, M.I. Williams // J. Amer. Chem. Soc. - 1967. - 89, N 5. - P. 6753-6757.
70. Racemization and bifunctional catalysts in peptide synthesis / H.C. Beyerman, W.M. van den Brink, F. Weygand et al. // Rec. trav. chim. - 1965. - 84, N 2. - P. 213-231.
71. König W., Geiger R. Chemistry and biology of peptides / Ed. J. Meinhofer. - Michigan: Ann. Arbor, Sci. Publ., 1972. - 343 p.
72. Pless J., Boissonnas R.A. Über die Geschwindigkeit der Aminolyse von Verschiedenen neuen, aktivierten, N-geschützten-Aminosäure-phenylestern, insbesondere 2,4,5-Trichlorphenylestern // Helv. chim. acta. - 1963. - 46, N 176. - S. 1609-1625.
73. Kupryszewski G., Formela M. O depsiptydach. 3. Zastosowanie α -bromopropionatu t-butylu do syntezy depsiptydow kwasu mlekowego // Roczn. Chem. - 1963. - 37. - S. 161-165.
74. Synthesis of N-carbobenzoylamino acid and peptide pentafluorophenyl esters as intermediates in peptide synthesis / L. Kisfaludy, J.E. Roberts, R.H. Johnson et al. // J. Org. Chem. - 1970. - 35, N 10. - P. 3563-3564.
75. Die Verwendung von Pentafluorphenylestern bei Peptidsynthesen / L. Kisfaludy, M. Löw, O. Nyeki et al. // Liebigs Ann. Chem. - 1973. - N 9. - S. 1421-1429.
76. Jones J.H., Young G.T. Amino acids and Peptides. 28. Anomeric acceleration of the aminolysis of esters. The use of monoesters of catechol in peptide synthesis // J. Chem. Soc. C. - 1968. - N 4. - P. 436-441.
77. Гершкович А.А., Серебряный С.Б. Синтез и применение водорастворимых 2-нитро-сульфофенильных эфиров в синтезе пептидов // тез. докл. IV Всесоюз. симпозиум по химии белков и пептидов. - (Минск, 5-8 сент., 1977 г.). - Минск, 1977. - С. 2188.
78. Гершкович А.А., Серебряный С.Б. Водорастворимые 2-нитро-4-сульфофенильные эфиры в синтезе пептидов // Биоорган. химия. - 1979. - 5, № 8. - С. 1125-1132.
79. Klausner Y.S., Meiri T.H., Schneider E. Peptide synthesis in aqueous solution with o-nitro-p-sulfophenyl esters // Peptides: Proc. 5th Amer. pept. symp. / Eds M. Goodman, J. Meinhofer. - New York: Wiley, 1977. - P. 536-538.
80. The second-order coupling rate constants for the reaction of N-Cbz-S-benzyl-L-cysteine active esters with valine methyl esters / J. Kovács, G.L. Mayers, R.H. Johnson et al. // J. Org. Chem. - 1970. - 35, N 6. - P. 1810-1815.
81. A novel and rapid peptide synthesis / L. Kisfaludy, I. Schön, T. Szirtes et al. // Tetrahedron Lett. - 1974. - N 19. - P. 1785-1786.

82. Boissonnas R.A., Guttman St., Jaquenoud P.-A. Synthesis of the L-arginyl-L-prolyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-seryl-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-arginine, a nonapeptide presenting the properties of the bradykinin // *Helv. chim. acta.* - 1960. - 43, N 6. - S. 1349-1358.
83. Nietsky R., Braunschweig E. Ueber die Einwirkung von Alkalien auf Ortho-orthonitrophenylhydrazin // *Chem. Ber.* - 1894. - 27. - S. 3381-3384.
84. Anderson G.W., Zimmerman J.E., Callahan F.M. The use of esters of N-hydroxysuccinimide in peptide synthesis // *J. Amer. Chem. Soc.* - 1964. - 86, N 9. - P. 1839-1842.
85. Wang K.T., Brattesani D.N., Weinstein B. Heterocyclic compounds. 6. An improved preparation of N-hydroxysuccinimide // *J. Heterocycl. Chem.* - 1966. - 3, N1. - P. 98.
86. Kovača J., Kisfaludy L., Ceprini M.Q. On the optical purity of peptide active esters prepared by N,N'-diocylhexyloxy carbodiimide and "complexes" of N,N'-diocylhexylcarbodiimide-penta-fluorophenol // *J. Amer. Chem. Soc.* - 1967. - 89, N 1. - P. 183-184.
87. Физер Л., Физер М. Реагенты для органического синтеза. - М.: Мир, 1970. - Т. 5. - 236 с.
88. Kappeler H. Synthese von L-Glutaminyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophyl-glycin // *Helv. chim. acta.* - 1961. - 44, N 2. - S. 476-491.
89. Col G.S., Doumani Th.F. Photochemical decomposition of t-butyl nitrite // *J. Amer. Chem. Soc.* - 1948. - 70, N 4. - P. 1516-1519.
90. Синтез и биологические свойства триптофансодержащего фрагмента белка миелина и его аналогов / А.А. Гершкович, В.К. Кибирев, С.Б. Серебряный и др. // *Химия природ. соединений.* - 1976. - 4. - С. 507-517.
91. Studies on encephalitogenic fragments of myelin protein / K. Suzuki, T. Abiko, N. Endo et al. // *Chem. Pharm. Bull.* - 1973. - 21, N 12. - P. 2627-2633.
92. Preparation of protected peptide hydrazides from the acids and hydrazine by diocylhexyloxy carbodiimide-hydroxybenzotriazole coupling / S.S. Wang, I.D. Kulesha, D.P. Winter et al. // *Int. J. Pept. and Prct. Res.* - 1978. - 11, N 4. - P. 297-300.
93. Никифорова Н.Б., Радина Л.Б. Фрагменты основных ядерных белков и их аналоги. 8. Синтез фрагментов гистона H1, соответствующих аминокислотным последовательностям 15-22, 16-22, 17-22, 19-22 и 21-22 // *Дурн. общ. химии.* - 1979. - 49, N 8. - С. 1878-1883.
94. Трио (2,2,6,6-тетраметил-3,5-гептадионат)европейский и трио (2,2,6,6-тетраметил-3,5-гептадионат)американский / Н.Ю. Корнилов, А.Г. Юрченко, А.В. Туров, М.И. Новикова // *Реактивы и особо чистые вещества.* - М.: НИИ техн.-экон. исслед. 1975. - Вып. 1. - С. 72-76.
95. Zaozal M. Pivaloyl chloride as a reagent in the mixed anhydride synthesis of peptides // *Collect. Czech. Chem. Commun.* - 1962. - 27, N 5. - P. 1273-1277.
96. Pat. 2399118 USA. 2-Oxazolidones / A.H. Homeyer. - Publ. 23.04.46.
97. Chen F.M.F., Kuroda K., Benoit N.L. A simple preparation of symmetrical anhydrides of N-alkoxycarbonylamino acids // *Synthesis.* - 1978, N 12. - P. 928-929.
98. Noble R.L., Yamashiro D., Li Ch.H. Human somatostatin // *Int. J. Pept. and Prct. Res.* - 1977. - 10. - P. 385-393.
99. Farthing A.C. Synthetic polypeptides. Pt I. Synthesis of oxazolid-2,5-diones and a new reaction of glycine // *J. Chem. Soc.* - 1950. - N 4. - P. 3213-3217.
100. The preparation and use of novel α -amino acid N-carboxyanhydrides / R. Hirschmann, H. Schwam, R.G. Strachan et al. // *J. Amer. Chem. Soc.* - 1971. - 93, N 11. - P. 2746-2754.
101. Bodanzky M., du Vigneaud V. A method of synthesis of long peptide chains using a synthesis of oxytocin as an example // *Ibid.* - 1959. - 81, N 21. - P. 5688-5691.
102. Synthesis of N-carboxbenzoxycarbonyl amino acid and peptide pentafluorophenyl esters as intermediates in peptide synthesis / L. Kisfaludy, J.E. Roberts, R.H. Johnson et al. // *J. Org. Chem.* - 1970. - 35, N 10. - P. 3563-3564.
103. Kisfaludy L., Schön J. Preparation and applications of pentafluorophenyl esters of 9-fluorenylmethylloxycarbonyl amino acid for peptide synthesis // *Synthesis.* - 1983, N 4. - P. 325-327.
104. А. с. 724501 СССР, МКИ С 07 с 103/52. Способ получения пентафторфенильных эфиров аминокислот / В.Н. Медведкин // *Открытия. Изобретения.* - 1980. - N 12. - С. 85.
105. А. с. 747854 СССР, МКИ С 07 207/40. Способ получения O-трифторацетил-N-оксоуксукцинимидов / С.М. Андреев, Л.А. Павлова, С.В. Рогжин // *Открытия. Изобретения.* - 1980. - N 26. - С. 100.
106. Sakakibara S., Inukai N. The trifluoroacetate method of peptide synthesis. 2. An improved synthesis of bradykinin // *Bull. Chem. Soc. Jap.* - 1966. - 39, N 7. - P. 1567-1572.
107. Guttman St., Pless J., Boissonnas R.A. Nouvelle synthèse de la bradykinine // *Helv. chim. acta.* - 1962. - 45, N 9. - S. 170-177.
108. Suzuki K., Sasaki Y. Studies on encephalitogenic fragments of myelin protein. 2. Solid phase synthesis of tryptophan-containing decapeptide // *Chem. Pharm. Bull.* - 1973. - 21, N 12. - P. 2634-2638.
109. Bower J.D., Guest K.P., Morgan B.A. Enkephalin. Synthesis of two pentapeptides isolated from porcine brain with receptor mediated opiate agonist activity // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. Part I.* - 1976. - N 23. - P. 2488-2492.
110. Романова В.П., Серебряный С.Б. Синтез метиловых эфиров тозилпептидов, содержащих N-метиламмонийные кислоты // *Биоорганич. химия.* - 1982. - 8, N 10. - С. 1301-1306.
111. Аняншин Л., Сластенина Е. Оксиксинлин // *Реактивы и препараты мед. назначения.* - 1938. - Вып. 1. - С. 283-293.
112. Van Zon A., Beyerman H.C. Repetitive excess mixed anhydride (REMA) synthesis of peptides // *Helv. chim. acta.* - 1973. - 56, N 5. - S. 1729-1740.
113. Improvements in the synthesis of secretin by the repetitive excess mixed anhydride (REMA) method / H.C. Beyerman, P. Kranenburg, W.M.M. Schaaper, D. Vaskamp // *Int. J. Pept. and Prct. Res.* - 1981. - 18, N 3. - P. 276-283.
114. Tilak M.A., Hoffmann I.A. Excess azide method of peptide synthesis // *J. Org. Chem.* - 1977. - 42, N 12. - P. 2098-2100.
115. Nozaki S., Muramatsu I. Rapid peptide synthesis in liquid phase. Preparation of angiotensin II and delta-sleep-inducing peptide by the "hold-in-solution" method // *Bull. Chem. Soc. Jap.* - 1982. - 55, N 7. - P. 2165-2168.
116. Vaber D.F., Hirschmann R., Denkwalter R.G. The synthesis of peptides in aqueous medium. 6. The synthesis of an unsymmetrical cystine peptide fragment of insulin // *J. Org. Chem.* - 1969. - 34, N 3. - P. 753-755.
117. Fletcher G.A., Jones J.H. A list of amino-acid derivatives which are useful in peptide synthesis // *Int. J. Pept. and Prot. Res.* - 1972. - 4, N 6. - P. 347-371.
118. Fletcher G.A., Jones J.H. A supplementary list of amino-acid derivatives which are useful in peptide synthesis // *Ibid.* - 1975. - 7, N 2. - P. 91-102.
119. Camble R., Garner R., Young G.T. Novel facilitation of peptide synthesis // *Nature.* - 1967. - 217, N 5125. - P. 247-248.
120. Wieland Th., Racky W. Peptidsynthese mit farbigen, am Ionenaustauscher fixierbaren Benzylestern // *Chimia.* - 1968. - 22, N 4. - S. 375-377.
121. Schwyzer R., Sieber P., Zatsko K. Farbige Schutzgruppen für

die Synthese von Polypeptiden // *Helv. chim. acta.* - 1958. - 41, N2. - S. 491-498.

122. Merrifield R.B. Solid phase peptide synthesis. 1. The Synthesis of a tetrapeptide // *J. Amer. Chem. Soc.* - 1963. - 85, N 14. - P. 2149-2154.

123. Letsinger R.L., Kornet M.J., Mahadevan V. Reactions on polymer supports // *Ibid.* - 1964. - 86, N 23. - P. 5163-5165.

124. Synthesis of peptides in solution on a polymeric support // M.M.Shemyakin, Yu.A.Ovchinnikov, A.A.Kiryushkin, I.V.Kozhevnikova // *Tetrahedron Lett.* - 1965. - N 27. - P. 2323-2327.

125. Mutter M., Umann R., Bayer E. Die Liquid-Phase-Methode zur Peptidsynthese: Strategie und experimentelle Grundlagen // *Liebigs Ann. Chem.* - 1975, N 5. - S. 901-915.

126. Kuns H. Synthesen mit 2-Phosphonoethoxycarbonyl-Schutzgruppen: Peptidsynthese in Wasser // *Angew. Chem.* - 1978. - 90, N 1. - S. 63-64.

127. Fridkin M., Patchornik A., Katchalski E. Use of polymers as chemical reagents // *J. Amer. Chem. Soc.* - 1966. - 88, N 13. - S. 3164-3165.

128. Complementary carrier peptide synthesis: general strategy and implication for prebiotic origin of peptide synthesis // J.A. Walder, R.Y. Walder, M.J. Heller et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* - 1979. - 76, N 1. - S. 51-55.

129. Bergmann M., Zervas L. Über ein allgemeines Verfahren der Peptid-Synthese // *Chem. Ber.* - 1932. - 65, N 7. - S. 1192-1201.

130. Carpenter F.H., Gish D.T. The application of p-nitrobenzyl chloroformate to peptide synthesis // *J. Amer. Chem. Soc.* - 1952. - 74, N 15. - P. 3818-3821.

131. Patchornik A., Amit B., Woodward R.B. Photosensitive protecting groups // *Ibid.* - 1970. - 92, N 21. - P. 6333-6335.

132. Der α , α -Dimethyl-3,5-dimethoxybenzyloxycarbonyl(Dbz)-Rest, eine photo- und säurelabile Stickstoff-Schutzgruppe für die peptidchemie // Ch.Birr, W. Loehinger, G. Stohnke, P. Lang // *Liebigs Ann. Chem.* - 1972. - 763. - S. 162-172.

133. McKay P.O., Albertson N.F. New amine - masking groups for peptide synthesis // *J. Amer. Chem. Soc.* - 1957. - 79, N 17. - P. 4686-4690.

134. Isonicotinylloxycarbonyl, a novel protecting group for peptide synthesis // F.G. Veber, W.J. Paleveda Jr., Y.C. Lee, R. Hirschmann // *J. Org. Chem.* - 1977. - 42, N 20. - P. 3286-3288.

135. Sieber P., Iselin B. Peptidsynthesen unter Verwendung der 2-(p-Diphenyl)-isopropylloxycarbonyl(Dpoc)-Amino-Schutzgruppe // *Helv. chim. acta.* - 1968. - 51, N 4. - S. 622-632.

136. Le Corre G., Guibe-Jampel E., Wakselman H. Groupements protecteur benzyloxycarbonyles substitués alcalinolabiles // *Tetrahedron.* - 1978. - 34, N 20. - P. 3105-3112.

137. Kemp D.S., Hoyng Ch.F. New protective groups for peptide synthesis. 1. The "Bic" group base and solvent lability of the 5-benzisoxazolylmethyleneoxycarbonylamino function // *Tetrahedron Lett.* - 1975. - N 52. - P. 4625-4628.

138. Carpino L.A., Han G.Y. The 9-fluorenylmethoxycarbonyl aminoprotecting group // *J. Org. Chem.* - 1972. - 37, N 22. - P. 3404-3409.

139. Anderson G.W., MacGregor A.C. t-Butyloxycarbonylamino acids and their use in peptide synthesis // *J. Amer. Chem. Soc.* - 1957. - 79, N 23. - P. 6180-6183.

140. Honda I., Shimonishi Y., Sakakibara S. t-Amyloxycarbonyl as a new protecting group in peptide synthesis // *Bull. Chem. Soc. Jap.* - 1967. - 40, N 10. - P. 2415-2418.

141. Haas W.L., Krumkalns E.V., Gerzon K. Adamantylloxycarbonyl, a new blocking group. Preparation of 1-adamantyl chloroformate. // *J. Amer. Chem. Soc.* - 1966. - 88, N 9. - P. 1988-1992.

142. Stevens C.M., Watanabe R. Amino acid derivatives. 1. Carboxyloxy derivatives of α -amino acids // *Ibid.* - 1950. - 72, N 2. - P. 725-727.

143. Carson J.F. N-2,2,2-trichloroethoxycarbonyl- α -amino acids // *Synthesis.* - 1981. - N 4. - P. 268-270.

144. Fisher E. Reduction der Aryl-sulfamide durch Jodwasserstoff // *Chem. Ber.* - 1915. - 48. - S. 93-102.

145. Schönheimer R. Ein Beitrag zur Bereitung von Peptiden // Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. - 1920. - 154, N 5. - S. 203-224.

146. Kidd D.A., King F.B. Phthaloyl-L-glutamic acid // *Nature.* - 1948. - 162. - P. 776.

147. Hillmann A., Hillmann G. Readily hydrolyzable acyl residues in peptide synthesis // *Z. Naturforsch.* - 1951. - 66, N 3. - P. 340-341.

148. Weygand F., Csendes E. N-Trifluoroacetyl-aminosäuren // *Angew. Chem.* - 1952. - 64, N 5. - S. 136.

149. Kenner G.W., Moore G.A., Ramage R. Phosphinoamides - a new class of amino protecting groups in peptide chemistry // *Tetrahedron Lett.* - 1976. - N 40. - P. 3623-3626.

150. Goerdeler J., Holst A. N-o-Nitrobenzolsulfonyl-aminosäuren und Aminosäureester // *Angew. Chem.* - 1959. - 71, N 24. - S. 775.

151. Helferich B., Moog L., Jünger A. Über den Ersatz reaktionsfähiger Wasserstoffatome in Zuckern, Oxy- und Aminosäuren durch den Triphenylmethyl-Rest // *Chem. Ber.* - 1925. - 58. - S. 872-886.

152. Zervas L., Theodoropoulos D.M. N-Tritylamino acids and peptides. A new method of peptide synthesis // *J. Amer. Chem. Soc.* - 1956. - 78, N 7. - P. 1359-1363.

153. Birkhofer L., Ritter A. Siliciumhaltige Aminosäurederivate // *Liebigs Ann. Chem.* - 1958. - 612. - S. 22-33.

154. Hope A., Halpern B. The use of ketimine derivatives of amino acids // *Tetrahedron Lett.* - 1972. - N 22. - P. 2261-2264.

155. Khalifa M.H., Jung G., Reiker A. Eine elektro-chemisch einfühbare Aminoschutzgruppe für die Peptidsynthese // *Angew. Chem.* - 1980. - 92, N 9. - S. 739-740.

156. Künzi H., Studer R.O. Sur l'utilisation des Toeylamino-carbonyl-Restes als Amino-Schutzgruppe in der Peptidchemie // *Helv. chim. acta.* - 1975. - 58, N 17/18. - S. 139-146.

157. Hirschmann R. Synthesis of an enzyme. Accomplishments and remaining problems. // *Intra-Sci. Chem. Repts.* - 1971. - 5, N 3. - P. 203-220.

158. Blaha K., Rudinger J. Rates of fission of some substituted benzyloxycarbonylglycines and two heterocyclic analogues with hydrogen bromide in acetic acid // *Collect. Czech. Chem. Commun.* - 1965. - 30, N 2. - P. 585-598.

159. Nebenreaktionen in der Peptidsynthese: tert-Butylierung des Tryptophans // E. Wünsch, E. Jueger, L. Kisfaludy, M. Löw // *Angew. Chem.* - 1977. - 89, N 5. - S. 330-331.

160. Sieber P., Iselin B. Selective acidolytische Spaltung von Aryloxycarbonyl-Aminoschutzgruppe // *Helv. chim. acta.* - 1968. - 51, N 4. - S. 614-622.

161. Carpino L.A. Oxidative reactions of hydrazines. 4. Elimination of nitrogen from 1,1-disubstituted-2-arenesulfonylhydrazides // *J. Amer. Chem. Soc.* - 1957. - 79, N 16. - P. 4427-4431.

162. Поздняв В.Ф. Применение ди-трет-бутилпиридоксальната для получения N-трет-бутилоксикарбонильных производных аминокислот // *Химия природ. соединений.* - 1974. - 2. - С. 764-767.

163. Керн Ф., Сандберг Р. Углубленный курс органической химии. - М.: Химия, 1981. - 520 с.

164. Weygand F., Frauendörfer E. Reductive Entfernung des N-Trifluoroacetyl- und N-Trichloroacetyl-restes durch Natriumborhydrid mit Anwendungen in der Peptidchemie // *Chem. Ber.* - 1970. - 103, N 8. - S. 2437-2449.

165. Wunsch E., Sprangenberg R. Die N-(Cyan-tert-butyloxycarbonyl)-Gruppe (CyOC), eine durch β -Eliminierung abspaltbare Aminoschutzgruppe // Chem. Ber. - 1971. - 104, N 8. - S. 2427-2429.
166. Jackson A.E., Jonstone R.A.W. Rapid selective removal of benzoyloxycarbonyl groups from peptides by catalytic transfer hydrogenation // Synthesis. - 1976. - N 10. - P. 685-687.
167. Anantharamaiah G.M., Sivanandaiah K.M. Transfer hydrogenation: a convenient for removal of some commonly used protecting groups in peptide synthesis // J. Chem. Soc. Perkin Trans. - 1977. - 1, N 5. - P. 490-491.
168. Rapid removal of protecting groups from peptides by catalytic transfer hydrogenation with 1,4-cyclohexadiene / A.M. Felix, E.P. Heimer, T.J. Lambros et al. // J. Org. Chem. - 1978. - 43, N 21. - P. 4194-4196.
169. Removal of benzyl-type protecting groups from peptides by catalytic transfer hydrogenation with formic acid / B. El Amin, G.M. Anantharamaiah, G.P. Roger, G.E. Meane // Ibid. - 1979. - 44, N 19. - P. 3442-3444.
170. Anwer M.K., Spatola A.F. An advantageous method for the rapid removal of hydrogenolysable protecting groups under ambient conditions: synthesis of leucine-enkephalin // Synthesis. - 1980. - N 11. - P. 929-932.
171. Lcasse G., Stiehl H.U. New catalyst for the hydrogenolytic removal of benzyl type protective groups from peptide derivatives // Z. Chem. - 1981. - 21, N 5. - P. 188.
172. Barltrop J.A., Schofield P. Photosensitive protecting groups // Tetrahedron Lett. - 1962. - N 16. - P. 697-699.
173. Chamberlin J.W. Use of 3,5-dimethoxybenzyloxycarbonyl group as a photosensitive N-protecting group // J. Org. Chem. - 1966. - 31, N 5. - P. 1658-1660.
174. Patchornik A., Amit B., Woodward R.B. Photosensitive protecting groups // J. Amer. Chem. Soc. - 1970. - 92, N 21. - P. 6333-6335.
175. Картер Г., Франк Р., Джонстон Х. Бензиловый эфир хлорогальной кислоты и его производные // Синтез органических препаратов. - М.: Изд-во ин-та хим. - 1952. - Т. 3. - С. 100-103.
176. Хейфец М.В., Лопырев В.А., Айзенштадт И.Н. Препаративный способ получения фосгена // Журн. прикл. химии. - 1968. - 41, N 6. - С. 1380.
177. Smith E.L. Action of carboxypeptidase on peptide derivatives of L-tryptophan // J. Biol. Chem. - 1948. - 175. - P. 39-47.
178. Synthesis of two protected hexapeptides containing the N-terminal and C-terminal sequences of arginine-vasopressin / P.G. Katsoyannis, D.T. Gish, G.P. Hees, V. du Vigneaut // J. Amer. Chem. Soc. - 1958. - 80, N 11. - P. 2558-2562.
179. Tritsch G.L., Woolly D.W. The synthesis of L-leucyl-L-valyl-L-cysteinylglycyl-L-glutamyl-L-arginine, an insulin fragment with streptogenin activity // Ibid. - 1960. - 82, N 11. - P. 2787-2793.
180. Synthese de la L-Histidyl-L-Phenylalanyl-L-Arginyl-L-Tryptophanyl-Glycyl-L-CHO-L-Lysyl-L-Prolyl-L-Valylamide/Boissonnas R.A., St. Guttman, R.L. Huguenin et al. // Helv. chim. acta. - 1958. - 41, N 6. - P. 1867-1882.
181. Zervas L., Winitz M., Greenstein J.P. Intermediates in the synthesis of N-terminal and C-terminal arginine peptides // J. Org. Chem. - 1957. - 22, N 11. - P. 1515-1521.
182. Willstätter R., Waldschmidt-Leitz E. Über die Abhängigkeit der katalytischen Hydrierung von der Gedenwart des Sauerstoffs // Chem. Ber. - 1921. - 54. - S. 113-138.
183. Препаративная органическая химия. - М.: Л.: Химия, 1964. - 907 с.
184. Kiso Y., Ukawa K., Akita T. Efficient removal of N-benzyl-
- oxycarbonyl group by a "push-pull" mechanism using thioanisole-trifluoroacetic acid, exemplified by a synthesis of met-enkephalin // J. Chem. Soc. Chem. Commun. - 1980. - N 3. - P. 101-102.
185. Синтез ди-трет-бутилпирокискарбоната из трет-бутилкарбоната натрия и хлорангидридов карбоновых кислот / В.Ф. Позднеев, Е.А. Смирнова, Н.Н. Подгорнова и др. // Журн. орган. химии. - 1979. - 45, N 1. - С. 106-109.
186. Получение трет-бутилкискарбонильных производных аминокислот с применением ди-трет-бутилпирокискарбоната / В.Ф. Позднеев, Н.Н. Подгорнова, Н.К. Зенцова и др. // Химия природ. соединений. - 1979. - N 4. - С. 543-548.
187. Позднеев В.Ф. Синтез трет-бутилкискарбонильных производных некоторых трифункциональных аминокислот с применением ди-трет-бутилпирокискарбоната // Биорган. химия. - 1977. - 3, N 12. - С. 1605.
188. Carpino L.A. New methods of introducing the carbo-t-butoxy protective group. Preparation of t-butyl cyanofornate // J. Amer. Chem. Soc. - 1960. - 82, N 11. - P. 2725-2731.
189. Carpino L.A., Giza C.A., Carpino B.A. O-Acylhydroxylamines. I. Synthesis of O-benzoylhydroxylamine // Ibid. - 1959. - 81, N 4. - P. 955-957.
190. Новый подход к синтезу трет-алкококарбонильгидразидов. Трет-алкил-N-нитрокарбонаты / Ф.К. Мутулис, Э.Э. Лиенины, М.Н. Гаваро, Г.И. Чипенс // Журн. орган. химии. - 1978. - 14, N 8. - С. 1605-1613.
191. Schnabel E. Verbesserte Synthese von tert-Butyloxycarbonyl-aminosäuren durch pH-Stat-Reaktion // Liebigs Ann. Chem. - 1967. - 702. - S. 188-192.
192. Gronka Z., Lammek B. A simple method of preparation of t-butoxycarbonyl amino acids // Synthesis. - 1974. - N 9. - P. 661-662.
193. Shabir K., Sivanandaiah K.M. Simplified procedure for the preparation of t-butyloxycarbonyl amino acids // Indian J. Chem. - 1977. - 15, N 1. - P. 80-81.
194. Tarbell D.S., Yamamoto Y., Pope B.M. New method to prepare N-tert-butoxycarbonyl derivatives and the corresponding sulfur analogs from di-tert-butyl dicarbonate or di-tert-butyl dithiolodicarbonates and amino acids // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. - 1972. - 69, N 3. - P. 730-732.
195. Позднеев В.Ф. Ацилирование аминокислот трет-алкилпирокискарбонатами // Химия природ. соединений. - 1971. - N 3. - С. 384-385.
196. Di-tert-butylidicarbonate ein Vorteilhaftes Reagenz zur Einführung der tert-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe / L. Moroder, A. Halllett, E. Wüschel et al. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. - 1976. - 257, N 11. - S. 1651-1653.
197. Позднеев В.Ф. Применение ди-трет-бутилпирокискарбоната для получения N-трет-бутилпирокискарбонильных производных аминокислот // Химия природ. соединений. - 1974. - N 6. - С. 764-767.
198. Halpern B., Nitecki D.E. The deblocking of t-butyloxycarbonyl-peptides with formic acid // Tetrahedron Lett. - 1967. - N 31. - P. 3031-3033.
199. Goodacre J., Pousford I.R., Stirling I. Selective removal of the t-butyloxycarbonyl protecting group in the presence of t-butyl and p-methoxybenzyl esters // Ibid. - 1975. - N 42. - P. 3609-3612.
200. Inouy K., Tanaka A., Otsuka H. Synthesis of corticotropin peptide. 11. Synthesis and biological properties of (1- β -alanine)-ACTH(1-18)-cotadecapeptida amide // Bull. Chem. Soc. Jap. - 1970. - 43, N 4. - P. 1163-1172.
201. А. с. 696010 СССР, МКЗ 07 С 101/42. Способ получения N-трет-амилококарбонильных производных аминокислот / В.Ф. Позднеев // Открытия. Изобретения. Промышленные образцы. Товарные знаки. - 1979. - N 41. - С. 95.
202. Беркенгейм А.И. Практикум по синтетическим лекарственным и душистым веществам и фторреактивам. М.: Госхимиздат, 1942. - 230 с.

203. Синтезы органических препаратов. - М.: Изд-во иностр. лит. - 1949. - Т. 2. - 655 с.
204. Новые условия синтеза 2-нитрофенилсульфенилхлорида и 2-нитрофенилсульфениламиноокислот / Р.Э.Бегнер, Л.К.Полева, М.А.Восекалина и др. // Изв. АН ЛатвССР. - 1979. - № 1. - С. 103-106.
205. Zervas L., Borovas D., Gazis E. New methods in peptide synthesis. I. Tritylsulfonyl and O-nitrophenylsulfonyl groups as N-protecting groups // J. Amer. Chem. Soc. - 1963. - 85, N 22. - P. 3660-3666.
206. Zervas L., Hamalidis C. New methods in peptide synthesis. 2. Future examples of the use of the O-nitrophenylsulfonyl group for the protection of amino groups // Ibid. - 1965. - 87, N 1. - P. 99-104.
207. Kessler W., Iselin B. Selective spaltung substituierter Phenyl-sulfonyl-Schutzgruppen bei Peptidsynthesen // Helv. chim. acta. - 1966. - 49, N 5. - S. 1330-1344.
208. Tun-Kyi A. Selective removal of the O-nitrophenylsulfonyl protecting group in peptide synthesis // Ibid. - 1978. - 61, N 3. - S. 1086-1090.
209. Sieber P., Iselin B. Über die Synthese von 2-(p-Biphenyl)-isopropylloxycarbonyl (Bpoo)-Aminosäuren und den Zerfall von Arylsulfonyl-carbonaten // Ibid. - 1969. - 52. - S. 1525-1531.
210. Gull H.C., Turner E.E. Orientation effects in the diphenyl series // Chem. Soc. - 1929. - P. 491-500.
211. Vinyl aromatic compounds. 5. Ortho-, meta- and para-isopropenylbiphenyls / D.T.Mowry, J.Dazzi, M.Renoll, R.W.Shortridge // J. Amer. Chem. Soc. - 1948. - 70, N 10. - P. 1916-1917.
212. Harris J.I., Work T.S. The synthesis of peptides related to gramicidin "S" and the significance of optical configuration in antibiotic peptides // Biochem. J. - 1950. - 46, N 8. - P. 582-589.
213. Weygand F., Geiger R. N-Trifluoracetyl-amino-säuren // Chem. Ber. - 1956. - 89, N 3. - S. 647-652.
214. Кошелева Г.Н., Налеская Г.Н. 6-Динзо-5-кето α -нормейцин // Методы получения химических реактивов и препаратов. - М.: ИРЕА, 1963. - С. 46-49.
215. Shallenberg E.E., Calvin M. Ethyl thiotrifluoroacetate as an acetylating agent with particular reference to peptide synthesis // J. Amer. Chem. Soc. - 1955. - 77, N 10. - P. 2779-2783.
216. Steglich W., Hinz S. Eine rationale Synthese von N-Trifluoracetylaminosäuren // Synthesis. - 1976. - N 6. - P. 399-401.
217. Curphey T.J. Trifluoracetylation of amino acids and peptides by ethyl trifluoroacetate // J. Org. Chem. - 1979. - 44, N 15. - P. 2885-2887.
218. Carson J.F. The preparation of methionine-containing peptides with trifluoroacetyl protection of amino groups and 2,2,2-trichloroethyl ester protection of carboxyl groups // Synthesis. - 1980. - N 9. - P. 730-733.
219. Solid-phase peptide synthesis of somatostatin using mild base cleavage of N-9-fluorenylmethyloxycarbonylamino acids / Chi-Deu Chang, A.M.Felix, M.H.Jimenez, J.Meinhofer // Int. J. Pept. and Prot. Res. - 1980. - 15, N 5. - P. 485-494.
220. Carpino L.A., Han G.Y. The 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino protecting group // J. Org. Chem. - 1973. - 38, N 24. - P. 4218.
221. Carpino L.A., Han G.Y. The 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino protecting group // Ibid. - 1972. - 37, N 22. - P. 3404-3409.
222. Amino-acids condensation in the preparation of N-9-fluorenylmethyloxycarbonylamino-acids with 9-fluorenylmethylchloroformate / M.Tessier, F.Albericio, E.Pedroso et al. // Int. J. Pept. and Prot. Res. - 1983. - 22, N 4. - P. 125-128.
223. Formation of oligopeptides during the synthesis of 9-fluorenylmethyloxycarbonyl amino acid derivatives / G.F.Sigler, W.D.Fuller, N.C.Chaturvedi et al. // Biopolymers. - 1983. - 22, N 11. - P. 2157-2162.
224. The use of β -methylthioethyl esters for the protection of carboxyl groups in peptide synthesis / M.J.S.A.Amaral, G.C.Baret, H.N.Rydon, J.E.Willett // J. Chem. Soc. C. - 1966. - N 8. - P. 807-813.
225. Митин В.В., Напеекина Л.В. Эфиры β -ациламиноокислот на основе диметиламинофенолов // Журн. орган. химии. - 1968. - 4, № 7. - С. 1484-1484.
226. Pass Sh., Amit B., Patchornik A. Racemization-free photochemical coupling of peptide segments // J. Amer. Chem. Soc. - 1981. - 103, N 25. - P. 7674-7675.
227. Curtius T. Goebel F. Ueber Glycocollether // J. Prakt.chem. - 1888. - 37. - S. 150-180.
228. Brenner M., Huber W. Herstellung von α -Aminosäureestern durch Alkoholyse der Methyl ester // Helv. chim. acta. - 1953. - 36, N 5. - S. 1109-1115.
229. Bergmann M., Zervas L., Salzmann L. Synthese von L-Asparagin und α -Glutamin // Chem. Ber. - 1933. - 66, N 8. - S. 1288-1290.
230. Schwyzler R., Sieber P. Synthese einer geschützten Pentapeptid-Sequenz des Tyrocidins A unter Verwendung farbiger Schutzgruppen und des p-Nitrobenzyl-Restes // Helv. chim. acta. - 1959. - 42, N 3. - S. 972-977.
231. Roeske R. Preparation of t-butyl esters of free amino acid // J. Org. Chem. - 1963. - 28, N 5. - P. 1251-1253.
232. Weygand F., Hunger K. Acylierung von Aminosäuren mit p-Methoxybenzylloxycarbonyl-azid // Chem. Ber. - 1962. - 95, N 1. - S. 1-6.
233. Mariner B., Kim Y.C., Navarre J.-M. The 2,2,2-Trichloroethyl group for carboxyl protection during peptide synthesis // Can. J. Chem. - 1973. - 51, N 9. - P. 208-214.
234. Kenner G.W. Phenyl-Ester als Carboxyl-Schutzgruppen // Angew. Chem. - 1959. - 71, N 23. - S. 741-742.
235. The use of phenyl esters in peptide synthesis / I.J.Galpin, P.M.Hardy, G.W.Kenner et al. // Tetrahedron. - 1979. - 35, N 21. - P. 2577-2582.
236. Hiskey R.G., Adams J.B. Sulfur-containing polypeptides. 1. Use of the N-benzhydryloxycarbonyl group and the benzhydryl ester // J. Amer. Chem. Soc. - 1965. - 87, N 17. - P. 3969-3973.
237. Birkofer L., Ritter A. Silylierung von Aminosäuren // Chem. Ber. - 1960. - 93, N 2. - S. 424-427.
238. The 2-trimethylsilylethyl residue, a selectively cleavable carboxylic acid protecting group / P.Sieber, R.H.Andreatta, B.Eisler et al. // Peptides: Proc. 5th Amer. pept. symp. / Eds. M. Goodman, J.Meinhofer. - New York, 1977. - P. 540-542.
239. Bednarek M.A., Bodanszky M. 9-Fluorenylmethyl esters // Int. J. Pept. and Prot. Res. - 1983. - 21, N 3. - P. 196-201.
240. Kessler H., Siegmair R. 9-Fluorenylmethyl esters as carboxyl protecting group // Tetrahedron Lett. - 1983. - 24, N 3. - P. 281-282.
241. Новая C-защитная группа - эфиры 2-(1-адамантил)-пропанола-2. Опыт введения адпог-группы / Ф.К.Мутулис, И.О.Мутуле, И.Ю.Налис и др. // Тез. докл. VI Всесоюз. симпози. по химии белков и пептидов. - Рига, 1983. - С. 230-231.
242. Kemp D.S., Hanson G. New protective groups for peptide synthesis. 4. Chromone-derived protection for amine and carboxyl functions // J. Org. Chem. - 1981. - 46, N 24. - P. 4971-4975.
243. Stewart P.H.C. The synthesis of some peptide derivatives using the 2,4,6-trimethylbenzyl carboxyl protecting group // Austral. J. Chem. - 1968. - 21, N 11. - P. 2831-2834.
244. Stelakatos G.C., Paganou A., Zervas L. New methods in peptide synthesis. Pt. 3. Protection of carboxyl group // J. Chem. Soc. C. - 1966. - N 21. - P. 1191-1199.
245. Barltrop J.A., Plant P.J., Schofield P. Photosensitive protective groups // J. Chem. Soc. Chem. Commun. - 1966. - N 22. - P. 822-823.

246. Isied S.S., Vassilian A., Lion J.M. Peptide formation in the presence of a metal ion protecting group. 4. Synthesis of penta- and hexapeptide sequences with the pentaamino cobalt (III) complex // J. Amer. Chem. Soc. - 1982. - 104, N 14. - P. 3910-3916.
247. Arai J., Muramatsu I. A simple and convenient method for esterification of triptophan and other amino acids // J. Org. Chem. - 1983. - 48, N 1. - P. 121-123.
248. Позднее В.Ф. Активация карбоксильной группы ди-трет-бутилпрокарбонатом. Новый метод получения ангидридов и ариламидов α -замещенных аминокислот // Тез. докл. V Всесоюз. симпози. по химии белков и пептидов. - Рига, 1983. - С. 284-285.
249. Weber U. Einfache, schonende Synthese von Aminosäuremethyl- und benzylestern // Z. Naturforsch. B. - 1976. - 31, N 8. - S. 1157-1158.
250. Dhaon M.K., Olsen R.K., Ramasany K. Esterification of N-protected α -amino acids with alcohol (carbodiimide) 4-(dimethylamino)-pyridine // J. Org. Chem. - 1982. - 47, N 10. - P. 1962-1965.
251. Synthesis of the 1-16 fragment of a lysozyme analogue / I.J. Galpin, F.E. Hancock, B.K. Handa et al. // Tetrahedron. - 1979. - 35, N 23. - P. 2771-2778.
252. Miller A.W., Stirling C.J.M. Elimination in 2-sulphonyl-ethyl carboxylates: a method for the protection of carboxy-groups in peptide synthesis // J. Chem. Soc. (C). - 1968, N 21. - P. 2612-2617.
253. Guibe-Jampel E., Wakselman M. Selective cleavage of p-nitrobenzyl esters with sodium dithionite // Synth. Commun. - 1982. - 12, N 3. - P. 219-223.
254. Rühlmann K. Umsatz der Halogensilane mit Aminosäuren // J. Prakt. Chem. - 1959. - 9, N 1. - S. 86-91.
255. Birkofer L., Ritter A., Neuhausen P. Silylierte Di- und Tripeptide und ihre Verwendung zu Peptidsynthesen // Liebigs Ann. Chem. - 1962. - 659. - S. 190-199.
256. Применение реакции окислительного в синтезе пептидов на основе α -лизина / Е.П. Крысин, В.Н. Карельский, А.А. Антонов, Э.Д. Глинка // Химия природ. соединений. - 1978. - № 4. - С. 482-485.
257. Андреев С.М., Козюков В.П., Миронова Н.В. Использование сильной защиты в пептидном синтезе. - М., 1980. - 24 с. (Обзор информ. НИИ техн.-экон. исслед. Сер. Элементоорг. соединения и их применение).
258. Guttman S., Boissonnas R.A. Synthèse du N-acetyl-L-seryl-L-tyrosyl-L-seryl-L-methionyl-L-glutamate de benzyla et de peptides apparentés // Helv. chim. acta. - 1958. - 41, N 6. - S. 1852-1867.
259. Suzuki K., Sasaki Y. Studies on encephalitogenic fragments of myelin protein. 2. Solid phase synthesis of tryptophan-containing decapeptide // Chem. Pharm. Bull. - 1973. - 21, N 12. - P. 2634-2638.
260. Shields J.E., McGregor W.H., Carpenter F.H. Preparation of benzyl and p-nitrobenzyl esters of amino acids // J. Org. Chem. - 1961. - 26, N 5. - P. 1491-1494.
261. А. с. 422724 СССР. МКИ С 07с 79/12. Способ получения п-нитробензилхлорида / С.Я. Микота, Г.И. Чипенко, М.Б. Звайгзне // Открытия. Изобретения. - 1974. - № 13. - С. 91.
262. Schwarz H., Arakawa K. The use of p-nitrobenzyl esters in peptide synthesis // J. Amer. Chem. Soc. - 1959. - 81, N 21. - P. 5691-5695.
263. Синтез и биологические свойства триптофаносодержащего фрагмента белка миелина и его аналогов / А.А. Гершкович, В.К. Кирилов, С.Б. Серезинский и др. // Химия природ. соединений. - 1976. - № 4. - С. 507-517.
264. Kotodziejczyk A.M., Sloboda M. A rapid procedure for the esterification of amino acids // Synthesis. - 1984. - N 10. - P. 865-866.
265. Болотов Б.А., Комаров В.А., Низовкина Т.В. Практические работы по органическому катализу. - Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1959. - 195 с.
266. Schröder E. Neue O-tert-Butyl-hydroxy aminosäure-Derivate und ihre Verwendung zur Synthese von Glukagon - Teilssequenzen // Liebigs Ann. Chem. - 1963. - 670. - S. 127-136.
267. Pavlov S., Tobić S., Arsenijević V., Dobijanec t-butyl-estera slobodi i N-tosilovanib α -amino-kiselina // Арх. фармац. - 1978. - 28, № 1/2. - S. 159-162.
268. Anderson G.W., Callahan F.M. t-Butyl esters of amino acids and peptides and their use in peptide synthesis // J. Amer. Chem. Soc. - 1960. - 82, N 13. - P. 3359-3363.
269. Давидович Ю.А., Голкин О.М., Рогожин С.В. Удобный способ получения трет-бутилового эфира глицина // Изв. АН СССР. Сер. хим. - 1977. - № 6. - С. 1444.
270. Birkofer L., Ritter A., Dickopp H. Notiz zur Darstellung von Trimethylsilanol // Chem. Ber. - 1963. - 96, N 6. - S. 1473-1474.
271. Klebe J.F., Finkbeiner H., White D.M. Silylations with Bis(trimethylsilyl) acetamide, a highly reactive silyl donor // J. Amer. Chem. Soc. - 1966. - 88, N 14. - P. 3390-3395.
272. Синтез замещенного 74-членного пептида с полной аминокислотной последовательностью α -бунгаротоксина / О.М. Волыпина, Т.Н. Дешко, И.И. Михалева, В.Т. Иванов // Биоорг. химия. - 1980. - 6, № 8. - С. 1155-1162.
273. Bodanszky M., Martinez J. Side reactions in peptide synthesis // Synthesis. - 1981. - N 5. - P. 333-356.
274. Schröder E., Kleiger E. Darstellung und Reaktionen von N-Substituierten L-Glutaminsäure derivaten // Liebigs Ann. Chem. - 1964. - 673. - S. 196-207.
275. Kilger E., Gibian H. Vereinfachte Darstellung und Reaktionen von Carbobenzoxy-L-glutaminsäure- α -halbestern // Ibid. - 1962. - 655. - S. 195-210.
276. Cyclohexyl ester as a new protecting group for aspartyl peptides to minimize aspartimide / J.P. Tan, T.-W. Wong, M.W. Riemen et al. // Tetrahedron Lett. - 1979. - N 42. - P. 4033-4036.
277. Neuberger A., Sanger F. The availability of the acetyl derivatives of lysine for Growth // Biochem. J. - 1943. - 27, N 4. - P. 515-518.
278. Erickson B.W., Merrifield R.B. Use of chlorinated benzyl-oxycarbonyl protecting groups to eliminate N-branchoing at lysine during solid-phase synthesis // J. Amer. Chem. Soc. - 1973. - 95, N 11. - P. 3757-3763.
279. Schwyzler R., Rittel W. Synthese von Peptid-Zwischenprodukten für den Aufbau eines oortootrop wirksamen Nonadsopeptids // Helv. chim. acta. - 1961. - 44. - S. 159-169.
280. The preparation of N-formyl-L-lysine and its application to the synthesis of peptides / K. Hoffmann, E. Stutz, G. Spühler et al. // J. Amer. Chem. Soc. - 1960. - 82, N 14. - P. 3727-3732.
281. Synthesis of a protected tetrapeptide amide containing the carboxyl terminal sequence of lysine-vasopressin / R.W. Roeseke, F.H.S. Stewart, R.J. Stedman, V. du Vigneaud // Ibid. - 1956. - 78, N 22. - P. 5883-5887.
282. The synthesis of protected peptide fragments of a staphylococcal nuclease / O.B. Anfinsen, D. Ontjes, M. Ohno et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. - 1967. - 58. - P. 1806-1811.
283. Bergmann M., Zervas L., Rinke H. Neues Verfahren zur Synthese von Peptiden des Arginins // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. - 1934. - 224, N 1/2. - S. 40-44.
284. Guttman S., Pless J., Boissonnas R.A. Nouvelle synthèse de la Bradykinine // Helv. chim. acta. - 1962. - 45. - S. 170-177.

285. Nishimura O., Fujino M. p-Methoxybenzenesulfonyl as a protecting group of guanidino function in peptide synthesis // Chem. and Pharm. Bull. - 1976. - 24, N 7. - P. 1568-1575.
286. Läger G., Leiger R. Der Adamantyl-(1)-oxycarbonyl-Rest als Schutzgruppe für die Guanidino-funktion des Arginins // Chem. Ber. - 1970. - 103, N 3. - S. 1727-1747.
287. Yajima H., Takeyama M., Kanaki J. N-mesitylene-2-sulfonylarginine // Chem. and Pharm. Bull. 1978. - 26, N 12. - P. 3752-3757.
288. du Vigneaud V., Behreue O.K. Method for protecting the imidazole ring of histidine during certain reactions and its application to the preparation of l-amino-N-methyl-histidine // J. Biol. Chem. - 1937. - 117, N 1. - P. 27-36.
289. Позднеев В.Ф. N^α, N^β-ди-трет-Алкилоксикарбонильные производные гистидина // Химия природ. соединений. - 1980. - № 3. - С. 379-383.
290. Fujii T., Sakakibara S. Studies on the synthesis of histidine peptides. 1. N^α-tosylhistidine derivatives as starting materials // Bull. Chem. Soc. Jap. - 1974. - 47, N 12. - P. 3146-3151.
291. Chillemi F., Merrifield R.B. Use of N^α-dinitrophenylhistidine in the solid-phase of the tricosapeptides 124-146 of human hemoglobin β-chain // Biochemistry. - 1969. - 8, N 11. - P. 4344-4346.
292. Brown T., Jones J.H. Protection of histidine side-chains with α-benzylloxymethyl- or α-brombenzylloxymethyl-groups // J. Chem. Soc. Chem. Commun. - 1981, N 13. - P. 648-649.
293. Patchornik A., Berger A., Katchalski E. Carbobenzoxy derivatives of histidine, imidazole and benzimidazole // J. Amer. Chem. Soc. - 1957. - 79, N 24. - P. 6416-6420.
294. Wunsch E., Fries G., Zwiok A. Darstellung und peptid-synthetische Verwendung von O-Benzyl-L-tyrosin // Chem. Ber. - 1958. - 91, N 3. - S. 542-547.
295. Erickson B.W., Merrifield R.B. Acid stability of several benzyl protecting groups used in solid-phase peptide synthesis // J. Amer. Chem. Soc. - 1973. - 95, N 11. - P. 3750-3756.
296. Overall B.G., Petrow V. Polymers of some basic and acidic amino-acids // J. Chem. Soc. - 1955. - N 1. - P. 232-236.
297. Позднеев В.Ф. O-трет-бутилоксикарбонилирование тирозина и других феноламино кислот ди-трет-бутилоксикарбонатом // Химия природ. соединений. - 1982. - № 4. - С. 129-130.
298. Wunsch E., Jentsch J. Zur Darstellung von Hydroxyaminosäure-tert-butyläthern // Chem. Ber. - 1964. - 97, N 9. - S. 2490-2496.
299. A photolabile protecting group for the phenolic hydroxyl function of tyrosine / B. Amit, E. Hazum, M. Eridkin, A. Patchornik // Int. J. Pept. and Prot. Res. - 1977. - 9, N 2. - P. 91-96.
300. Ueki M., Inazu T. The preparation of the hydroxyl function in the tyrosine side chain by the dimethylphosphinothioyl group // Bull. Chem. Soc. Jap. - 1982. - 55, N 1. - P. 204-207.
301. Sugano H., Miyoshi M. A convenient synthesis of N-tert-butyl-oxycarbonyl-O-benzyl-L-serine // J. Org. Chem. - 1976. - 41, N 13. - P. 2352-2353.
302. Schröder E. Neue O-tert-Butyl-hydroxyaminosäure-Derivate und ihre Verwendung zur Synthese von Glukagon - Teilsequenzen // Liebigs Ann. Chem. - 1963. - 670. - S. 127-136.
303. Elliott D.F. The stereochemistry of an oxazolins derivats of threonine. Improvement of a recent threonine synthesis // J. Chem. Soc. - 1949. - N 3. - P. 589-584.
304. Greenstein J.P., Winitz M. Chemistry of amino acids. - New York; London: Wiley, 1961. - Vol. 3. 1920 p.
305. Acetamidomethyl. A novel thiol protecting group for cysteine / D.F. Veber, J.D. Milkowski, S.L. Varga et al. // J. Amer. Chem. Soc. - 1972. - 94, N 15. - P. 5456-5461.
306. Chakaravary P.K., Olsen R.K. Benzamidomethyl group as a thiol protecting group for cysteine, N-methylcysteine and corresponding N-tert-butyloxycarbonyl derivatives // J. Org. Chem. - 1978. - 43, N 6. - P. 1270-1271.
307. Pastuszak I.I., Chimiak A. tert-Butyl group as thiol protection in peptide synthesis // Ibid. - 1981. - 46, N 9. - P. 1868-1874.
308. Birr C. Peptidsynthesen mit 3,5-Dimethoxy(α, α-dimethyl)benzylloxycarbonyl (Ddz)-Aminosäuren: Merrifieldsynthese des alleisits geschützten C-terminalen Dekapeptides der Insulin-A-Kette an einem Polystyrolgel // Liebigs Ann. Chem. - 1973. - N 10. - S. 1652-1662.
309. Berse C., Boucher R., Piché L. Preparation of L-cystinyl and L-cysteinyl peptides through catalytic hydrogenation of intermediates // J. Org. Chem. - 1957. - 22, N 7. - P. 805-808.
310. Iselin B. Derivate von L-Methionin-sulfoxid und ihre Verwendung für Peptidsynthesen // Helv. chim. acta. - 1961. - 44, N 8. - S. 61-78.
311. König W., Geiger R. Eine neue Amid-Schutzgruppe // Chem. Ber. - 1970. - 103, N 7. - S. 2041-2051.
312. Shimonishi Y., Sakakibara S., Akabori S. Protection of amid-nitrogen with xantyl group during peptide synthesis // Bull. Chem. Soc. Jap. - 1962. - 35, N 12. - P. 1966-1970.
313. Improved solid-phase synthesis of triptophan-containing peptides / M. Ohno, S. Tsukamoto, S. Nakisumi, N. Izumiya // Ibid. - 1972. - 45, N 6. - P. 2852-2855.
314. New protecting groups for the indole ring of triptophan in peptide synthesis: 2,4,6-trimethyloxycarbonyl and 4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzenesulfonyl groups / T. Fukuda, M. Wakimasa, Sh. Kobayashi, M. Fujino // Chem. and Pharm. Bull. - 1982. - 30, N 8. - P. 2825-2835.
315. A novel high-yield synthesis of γ-esters of glutamic acid and β-esters of aspartic acid by the copper-catalyzed hydrolysis of their diesters / R.L. Prestidge, D.R.K. Harding, J.E. Battersby, W.S. Hancock // J. Org. Chem. - 1975. - 40, N 22. - P. 3287-3288.
316. Benoit L. A synthesis of isosparagine from β-benzyl aspartate // Can. J. Chem. - 1962. - 40, N 3. - P. 570-572.
317. Synthèse de la L-histidyl-L-phénylalaninyl-L-argininyl-L-tryptophanyl-glycyl-ε-CBO-L-lysyl-L-prolyl-L-valylamide / R.A. Boissonnas, St. Guttman, R.L. Huguenin et al. // Helv. chim. acta. - 1958. - 41. - P. 1867-1882.
318. Gibian H., Schröder E. Synthesen von Argininhaltigen Peptiden // Liebigs Ann. Chem. - 1961. - 642. - S. 145-162.
319. Hayakawa T., Fujiwara Y., Naguchi I. A new method of reducing nitroarginine-peptide into arginine-peptide with reference to the synthesis of poly-L-arginine hydrochloride // Bull. Chem. Soc. Jap. - 1967. - 40, N 5. - P. 1205-1208.
320. Wunsch E., Wendelberger G. Zur Synthese des Glukagons. 11. Darstellung der sequenz 16-23 // Chem. Ber. - 1967. - 100, N 1. - S. 160-172.
321. Smithwick E.L., Jr., Shuman R.T. A new synthesis of N^α, N^{GO}-tribenzylloxycarbonyl-L-arginine and related derivatives // J. Org. Chem. - 1974. - 39, N 23. - P. 3441-3442.
322. Wolman Y., Landkany D., Frankel M. Synthesis of activated esters of N-protected amino acids // J. Chem. Soc. C. - 1967. - N8. - P. 689-692.
323. Turán A., Patthy A., Bajusz S. Removal of the nitro group from nitroarginine and nitroarginine peptides // Acta Chim. - 1975. - 85, N 3. - P. 327-332.
324. Synthèse du glycol-N-CBO-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-N-CBO-L-lysyl-N-CBO-L-lysyl-N^ε-CBO-L-lysyl-L-argininyl-L-argininyl-L-prolyl-L-valinate de méthyle, un peptide représentant la sequence 10 à 20 de l'ACTH / R.A. Boissonnas, St. Guttman, P.-A. Jaquenoud et al. // Helv. chim. acta. - 1961. - 44, N 16. - P. 123-130.

325. Van der Eijk I., Nolte R.I., Zwicker I.W. A simple and mild method for the removal of the N-benzyloxycarbonyl protecting group // J. Org. Chem. - 1980. - 45, N 3. - P. 547-548.
326. Katchalski E., Sela M. The synthesis and spectrophotometric study of poly-L-tyrosine and poly-3,5-diiodotyrosine // J. Amer. Chem. Soc. - 1953. - 75, N 21. - P. 5284-5289.
327. Okawa K. Optical resolution of O-benzyl-D,L-serine and synthesis of D,L-serine peptides // Bull. Chem. Soc. Jap. - 1956. - 29, N 5. - P. 486-488.
328. Wünsch E., Fürst G. Racematspaltung von O-Benzyl-D,L-Serin // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. - 1962. - 329, N 1/2. - S. 109-112.
329. Chi-Huey Wong, Meung-Pei Ho, Kung-Tsung Wang. Preparation of optically pure N-tert-butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-serine and its antipode // J. Org. Chem. - 1978. - 43, N 18. - P. 3604.
330. Tailor U.P., Dyckes D.P., Cox I.R. Decomposition of amino acid coooper complexes using thioacetamide // Int. J. Pept. and Prot. Res. - 1982. - 19, N 2. - P. 158-161.
331. Sifferd R.H., du Vigneaud V. A new synthesis of carnosine, with some observations on the splitting of the benzyl group from carbobenzoxy derivatives and from benzylthio ethers // J. Biol. Chem. - 1935. - 108, N 3. - P. 753-761.
332. Use of anhydrous hydrogen fluoride in peptide synthesis. I Behaviour of various protective groups in anhydrous hydrogen fluoride / S. Sakakibara, Y. Shimonishi, Y. Kishida et al. // Bull. Chem. Soc. Jap. - 1967. - 40, N 9. - P. 2164-2167.
333. Современные методы биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. - М.: Медицина, 1968. - 157 с.
334. Sakakibara S., Shimonishi V. A new method for releasing excitin from fully-protected nona-peptides using anhydrous hydrogen fluoride // Bull. Chem. Soc. Jap. - 1965. - 38, N 8. - P. 1412-1413.
335. Lenard J., Robinson A.B. Use of hydrogen fluoride in Merrifield solid-phase peptide synthesis // J. Amer. Chem. Soc. - 1967. - 89, N 1. - P. 181-182.
336. Вольпина О.М., Михалева И.И., Иванов В.Т. Проблемы синтеза крупных пептидов и белков // Биоорганическая химия. - 1982. - 8, № 1. - С. 5-49.
337. Pless I., Bauer W. Bortris (trifluoroacetat) zur Abspaltung von Schutzgruppen in der Peptidchemie // Angew. Chem. - 1973. - 85, N 1. - S. 142.
338. Руководство по препаративной неорганической химии / Под ред. Г. Бауэра. - М.: Изд-во иностр. лит., 1956. - 374 с.
339. Неорганические синтезы. - М.: Изд-во иностр. лит., 1952. - Сб. 3. - 30 с.
340. Young G.T. Protection during peptide synthesis: some new directions // Biopolymers. - 1981. - 20, N 10. - P. 1805-1809.
341. Barany G., Merrifield R.B. A new amino protecting group removable by reduction. Chemistry of dithiasuccinoyl (Dts) function // J. Amer. Chem. Soc. - 1977. - 99, N 22. - P. 7363-7365.
342. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity / J. Hughes, T.W. Smith, H.W. Kosterlitz et al. // Nature. - 1975. - 258, N 5536. - P. 577-579.
343. Losse G., Wehrstedt K.-D. Eine vereinfachte Synthese von Methionin-Enkephalin // J. Pract. Chem. - 1978. - 320, N 6. - S. 963-966.
344. Shattenkerk C., Voskuyl-Holtkamp I., Bokhorst R. Synthesis of possible rennin substrates // Rec. trav. chim. Pays-Bas. - 1973. - 92, N 1. - P. 92-116.
345. Kisfaludy L., Nyeki O. A novel and rapid synthesis of angiotensin and its Asp¹-analogues // Acta chim. Acad. sci. hung. - 1975. - 86, N 3. - P. 343-345.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОТ РЕДАКТОРА	3
ПРЕДИСЛОВИЕ	4
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. МЕТОДЫ ОБРАЗОВАНИЯ ПЕПТИДНОЙ СВЯЗИ	10
1.1. Способы активации карбоксильной группы	10
1.2. Механизмы активации карбоксильной группы	17
1.3. Методика синтеза реагентов	38
1.3.1. Карбонилимидный метод	38
Методики	
Дипептидоэтилкарбонилимид	39
Синтез пептидов карбонилимидным методом	40
1.3.2. Синтез нуклеофильных добавок	40
Методики	
1-Оксибензотриазол	41
N-Оксиуксимириды	42
"Комплекс F" (комплекс ДПК с пентафторфенолом)	
1.3.3. Синтез с использованием ЭДХ	42
1.3.4. Карбонилимидазолидный метод	43
Методики	
N,N-Карбонилимидазол	43
1.3.5. Азидный метод	44
Методики	
трет-Бутилитрит	44
Общий метод синтеза пептидов по Хиршману	46
Синтез дифенилфосфорида	47
1.3.6. Метод смешанных ангидридов	47
Методики	
Изобутиловый эфир хлоруксусной кислоты	48
Хлорангидрид триметилуксусной кислоты (пivaloил-хлорид)	49
Синтез N,N-бис(2-оксо-3-оксазолидинил)фосфорида	49
Общий метод синтеза амидов с использованием BOP-Cl	50
Общий метод синтеза симметричных ангидридов N-защищенных аминокислот	51
1.3.7. Карбоксангидридный метод	52
Методики	
Метод синтеза с использованием о-нитрофенилоуль-фенил-N-карбоксангидридов аминокислот	57
1.3.8. Метод активированных эфиров	58
p-Нитрофениловые эфиры N-защищенных аминокислот	59
N-Оксиуксимиридные эфиры	60
Пентафторфениловые эфиры	62
1.3.9. Реагенты перэтерификации	65
Методики	
N-Оксиуксимиридный эфир трифторуксусной кислоты	65
Пентафторфениловый эфир трихлоруксусной кислоты	66
1-А-Нафтилсульфонилкарбонилбензотриазол	67
1.3.10. Синтез пептидов с незащищенной карбоксильной группой с помощью активированных эфиров	68
Методики	
Использование p-нитрофениловых эфиров N-защищенных аминокислот	68

Использование <i>N</i> -оксисульфонилированных эфиров <i>N</i> -защитных аминокислот	69
Использование 2-нитро-4-сульфениловых эфиров	70
1.3.11. Укоренные методы синтеза пептидов	72
Методики	
Метод последовательного синтеза пептидов с использованием избытка омешанных ангидридов (<i>КЕМА</i>)	72
Использование азидов	73
Укоренный синтез пептидов с избытком пентафторфениловых эфиров	74
Использование <i>МСА</i> для синтеза пептидов без выделения	75

ГЛАВА 2. ЗАЩИТА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП АМИНОКИСЛОТ. ЗАЩИТА АМИНОГРУПП 76

2.1. Основные способы удаления защитных групп и механизмы соответствующих процессов	86
2.1.1. Защитные группы, удаляемые кислотами	86
2.1.2. Защитные группы, удаляемые основаниями	91
2.1.3. Защитные группы, отщепляемые каталитическим гидролизом	94
2.1.4. Защитные группы, удаляемые УФ-облучением	95
2.2. Методы синтеза реагентов, используемых для блокирования аминогрупп пептидов и аминокислот	96
2.2.1. Карбобензокси-группа	96
Методики	
Карбобензоксихлорид	96
Синтез бензилоксикарбониламинокислот	99
Удаление бензилоксикарбонильной группы	102
Получение наоншенного раствора бромистого водорода в ледяной уксусной кислоте	103
Отщепление <i>Z</i> -группы каталитическим гидрогенолизом	104
Приготовление палладиевой черни	105
Общий метод гидрогенолиза пептидов	107
2.2.2. трет-Бутилоксикарбонильная группа	109
Методики	
Синтез реагентов для получения Вос-аминокислот	109
Синтез трет-бутилоксикарбониламинокислот по Шнабелю	113
Другие методы синтеза Вос-аминокислот	115
Синтез Вос-аминокислот с использованием ди-трет-бутилоксикарбоната	117
Отщепление трет-бутилоксикарбонильной группы	123
2.2.3. трет-Амиллоксикарбонильная группа (<i>Aos</i>)	124
Методики	
Получение трет-амилазидоформата	124
Синтез <i>Aos</i> -аминокислот	126
2.2.4. <i>o</i> -Нитрофенилоульфилильная группа (<i>Nps</i>)	129
Методики	
<i>o</i> -Нитросульфенилхлорид	129
Общий метод синтеза <i>o</i> -нитрофенилсульфениламинокислот	135
Удаление <i>Nps</i> -группы	135
2.2.5. 2-(<i>p</i> -Бифенил)-изопропилоксикарбонильная группа (<i>Broc</i>)	135
Синтез 2-(<i>p</i> -бифенил)-изопропилоксикарбонилзида	135
Синтез <i>Broc</i> -аминокислот	138
Удаление <i>Broc</i> -группы	139
2.2.6. <i>p</i> -Толуолсульфонильная группа (<i>Tos</i>)	140
2.2.7. Трифторацетиловая защитная группа (<i>TFA</i>)	141
Методики	
Трифторацетилирование аминокислот	144
Удаление трифторацетиловой защитной группы	145

2.2.8. 9-Флуоренилметилоксикарбонильная группа (<i>Fmoc</i>)	146
Методики	
Синтез 9-флуоренилметилхлорформата	146
Синтез 9-флуоренилметилоксикарбониламинокислот	147
Отщепление флуоренилметилоксикарбонильной защитной группы	151

ГЛАВА 3. ЗАЩИТА КАРБОКСИЛЬНОЙ ГРУППЫ 152

3.1. Основные способы введения сложноэфирных <i>C</i> -защитных групп	158
3.2. Свойства защитных групп и способы их удаления	161
3.3. Методы этерификации	171
Методики	
Метилловые и этиловые эфиры аминокислот	171
Бензиловые эфиры аминокислот	175
<i>p</i> -Нитробензиловые эфиры аминокислот	176
трет-Бутиловые эфиры аминокислот	180
Триметилоксильные эфиры аминокислот	185

ГЛАВА 4. ЗАЩИТА БОКОВЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП 187

4.1. Защита боковых функциональных групп дикарбоновых аминокислот	194
Бензиловый эфир <i>L</i> -глутаминовой кислоты	195
4.2. Защита боковых функциональных групп диаминакарбоновых кислот	196
Методики	
<i>N_ε</i> -Карбобензокси- <i>L</i> -лизин	196
<i>N_ε</i> -трет-Бутилоксикарбонил- <i>L</i> -лизин	197
<i>N_ε</i> -Дикарбобензокси- <i>L</i> -лизин	197
<i>N_ε</i> -(2,4-Дихлорбензилоксикарбонил)- <i>L</i> -лизин	198
4.3. Защита гуанидиновой группы аргинина	200
Методики	
<i>ω</i> -Нитро- <i>L</i> -аргинин	201
<i>ω</i> -Тозил- <i>L</i> -аргинин	201
<i>ω</i> - <i>p</i> -Метоксибензилсульфонил- <i>L</i> -аргинин	202
Трикарбобензокси- <i>L</i> -аргинин	203
4-Хлорформилокоадамantan	206
<i>N^α</i> -Бензилоксикарбонил- <i>N^α</i> -ди(адамантил-1-оксикарбонил)- <i>L</i> -аргинин	206
Удаление боковых защитных групп аргинина	207
4.4. Защита имидазольного кольца гистидина	208
Методики	
<i>N^{im}</i> -Бензил- <i>L</i> -гистидин	209
Синтез <i>N^{im}</i> -тозил- <i>L</i> -гистидина	210
Синтез трет-бутилоксикарбонил- <i>N^{im}</i> -динитрофенилгистидина	211
4.5. Защита гидроксильной группы тирозина	212
Методики	
<i>O</i> -Бензил- <i>L</i> -тирозин	212
<i>N, O</i> -Дикарбобензокси- <i>L</i> -тирозин	213
<i>O</i> -(2,6-Дихлорбензил)- <i>L</i> -тирозин	213
4.6. Защита гидроксильной группы серина и треонина	214
4.7. Защита меркаптогруппы цистеина	216
Методики	
<i>S</i> -Бензил- <i>L</i> -цистеин	216
Трифторацетат <i>S</i> -бензамидометил- <i>L</i> -цистеина	217
Удаление <i>S</i> -бензамидометильной группы	218
4.8. Защита амидных групп глутамина и аспарагина	218
4,4'-Диметоксибензгидрильная группа (<i>Mib</i>)	219

4.9. Защита индольного ядра триптофана	222
Методики	
N^{in} -Формил- L -триптофан.	222
N^{α} -Вос- N^{in} -формил- L -триптофан.	223
Удаление N^{in} -формильной группы триптофана.	223
4.10. Защита боковой группы метионина	223
L -Метионин- d, l -сульфоксид	223
Удаление защитной группы метионина.	227
4.11. Удаление защитных групп безводным фтористым водородом	225
Использование трио-(трифторацетата) бора для удаления защитных групп.	227
4.12. Общая стратегия применения защитных групп	229
ПРИЛОЖЕНИЕ	238
Примеры синтеза некоторых биологически активных пептидов	238
Метисининанкефалин	238
Антигистонин	240
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.	244

Монография

Александр Абрамович Гершкович
Владимир Константинович Кибирев

СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ. РЕАГЕНТЫ И МЕТОДЫ

Утверждено к печати ученым советом
Института органической химии АН УССР

Редактор А.И.Кузьменко
Оформление художника В.А.Потиевского
Художественный редактор И.Е.Писарева
Технический редактор Т.М.Зубрицкая
Корректоры Е.Н.Межеричкая, С.И.Колесник

ИБ № 8258

Подп. в печ. 03.02.87. Б4 25527. Формат 60x84/16. Бум. офо. № 1.
Офс. печ. Усл. печ. л. 15,35. Усл. кр.-отт. 15,58. Уч.-изд.л. 15,52.
Тираж 850 экз. Заказ 7-165. Цена 2 р. 40 к.

Издательство "Наукова думка". 252601 Киев 4, ул. Репина, 3.
Киевская книжная типография научной книги. 252004 Киев 4, ул. Репина, 4.